Série A N° 4487
N° d'Ordre 5334

# THÈSES

PRESENTEES A LA

## FACULTÉ DES SCIENCES
## DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ES SCIENCES

par

Mary PAIS

1re THESE - LA PANDAMINE, ALCALOIDE DU PANDA OLEOSA PIERRE (PANDACEES)

2e THESE - PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

Soutenues le 3 avril 1965 devant la Commission d'examen.

MM. PREVOST Président
JANOT
FETIZON } Examinateurs

Série A N° 4487
N° d'Ordre 5334

# THÈSES

PRESENTEES A LA

## FACULTÉ DES SCIENCES
## DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR ES SCIENCES

par

Mary PAIS

1re THESE - LA PANDAMINE, ALCALOIDE DU PANDA OLEOSA PIERRE (PANDACEES)

2e THESE - PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

Soutenues le 3 avril 1965 devant la Commission d'examen.

MM. PREVOST Président
JANOT
FETIZON } Examinateurs

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

Doyen... M. ZAMANSKY

PROFESSEURS

| | | |
|---|---|---|
| BRELOT..... | T | Analyse supérieure |
| PRENANT..... | T | Anatomie et histologie comparée |
| GRASSE ..... | T | Evolution des êtres organisés |
| PREVOST..... | T | Chimie organique |
| WYART..... | T | Minéralographie |
| TEISSIER..... | T | Zoologie |
| MANGENOT..... | T | Biologie végé (Orsay) |
| AUGER..... | T | Physique quantique et relativité |
| MONNIER..... | T | Physiologie générale |
| PIVETEAU..... | T | Paléontologie |
| ROCARD..... | T | Physique ENS |
| CARTAN..... | T | Mathématiques ENS |
| LAFITTE..... | T | Chimie générale |
| N..... | T | Géométrie supérieure |
| COULOMB..... | T | Physique du globe |
| Mle COUSIN..... | T | Biologie animale SPCN |
| CHRETIEN..... | T | Chimie minérale |
| BOCQUET..... | T | Zoologie |
| KASTLER..... | T | Physique ENS |
| EPHRUSSI..... | T | Génétique |
| RIVIERE..... | T | Géologie SPCN & sédiment (Orsay) |
| GAUTHERET.... | T | Biologie végétale PCB |
| LUCAS R..... | T | Recherches physiques |
| THOMAS A..... | T | Biologie cellulaire |
| ARNULF..... | T | Optique appliquée |
| MORAND ..... | T | Physique enseignement |
| SOLEILLET..... | T | Physique PCB |
| FORTIER..... | T | Mécanique exp. des fluides |
| DRACH..... | T | Zoologie |
| QUENEY..... | T | Météo & dynamique atmos |
| GALLIEN..... | T | Embryologie |
| EICHORN..... | T | Botanique |
| DE CUGNAC .... | T | Biologie végétale SPCN |
| Mle CAUCHOIS.. | T | Chimie physique |
| THELLIER..... | T | Physique du globe |
| L'HERITIER .... | T | Biologie générale Orsay |
| GRIVET..... | T | Radioélectricité Orsay |
| PONCIN..... | T | Mécanique générale |
| DU BREUIL..... | T | Arith & Théorie des nombres |
| QUELET..... | T | Chimie organique |
| CAGNIARD..... | T | Géophysique appliquée |
| CHAMPETIER.. | T | Chimie macromoléculaire |
| CUVILLIER.... | T | Micropaléontologie |
| JUNG..... | T | Géologie |
| TRILLAT..... | T | Microscopie et diffrac-élec |
| WIEMANN..... | T | Chimie organ. & structurale |
| JACQUINOT.... | T | Spectrocospie et physique céleste (Orsay) |
| VASSY..... | T | Physique de l'atmosphère |
| DESTOUCHES.. | T | Théorie physique |
| AMIEL..... | T | Chimie générale |
| HOCART..... | T | Minérall & cristal |
| J. P. MATHIEU. | T | Physique optique |
| COUTEAUX.... | T | Cytologie |
| MAY..... | T | Zoologie |
| CHOQUET..... | T | Théorie des fonctions et topologie |
| FELDMANN.... | T | Biologie végétale marine |
| GUINIER..... | T | Physique des solides (Orsay) |
| JOST..... | T | Physiologie comparée |
| FORTET..... | T | Calcul des probabilité et physique mathématiques |
| SCHWARTZ.... | T | Calcul dif & Intégral |
| CHOUARD..... | T | Physiologie végétale |
| MALAVARD.... | T | Aviation (technique aéron.) |
| NORMANT..... | T | Synthèse organique |
| BENARD..... | T | Chimie minérale |
| BUVAT..... | T | Botanique ENS |
| DUGUE..... | T | Statistique mathématiques |
| SOULAIRAC.... | T | Psychophysiologie |
| ULRICH..... | T | Physiologie végé. Appli. |
| MARECHAL.... | T | Optique théo. & appliquée |
| KIRRMANN.... | T | Théories chimiques |
| CHADEFAUD.. | T | Botanique |
| Mle LE BRETON | T | Physio de la nutrition |
| LELONG..... | T | Appli de l'ana. à la géométrie |
| DEVILLERS.... | T | Anatomie & histo comparées |
| EHRESMANN.. | T | Topologie algébrique |
| FRANCON..... | T | Physique SPCN |
| GLANGEAUD... | T | Géogra. phys. & géol. |
| DODEMENT.... | T | Mathématiques MGP |
| PISOT..... | T | Technique math de la physique |
| ROCH..... | T | Géologie |
| SCHATZMANN. | T | Astrophysique |
| TERMIER..... | T | Géologie générale |
| ZAMANSKY.... | T | Mathématiques générale |
| LENNUIER..... | T | Physique MGP |
| RIZET..... | T | Génétique Orsay |
| ROUTHIER..... | T | Géologie appliquée |
| Mme TONNELAT | T | Physique théorique |
| DIXMIER..... | T | Mathématiques MPC |
| SOUCHAY..... | T | Chimie générale |
| AIGRAIN..... | T | Electro.techn.géné. |
| BRUSSET..... | T | Chimie systématique |
| M. LEVY..... | T | Physique théorique des hautes énergies (Orsay) |
| Mme CHAIX.... | T | Chimie biologique |
| Mme HUREL PY | T | Biologie végétale PCB |
| PANNETIER.... | T | Chimie générale |
| BRUN..... | T | Mécanique des fluides I |
| LEDERER..... | T | Chimie biologique (Orsay) |
| Mme DUBREIL. | T | Mathématiques (agréga) |
| Mme LELONG.. | T | Math II ENS |
| BELLAIR..... | T | Géologie SPCN |
| COTTE..... | T | Physique électricité |
| DUBOIS J. E.... | T | Chimie organique |
| LAMOTTE..... | T | Zoologie ENS |
| MICHEL A..... | T | Chimie minérale Orsay |
| OLMER ..... | T | Energétique générale |
| ROUAULT..... | T | Electricité (Orsay) |
| GAUTHIER..... | T | Mecanique appliquée |
| BARCHEWITZ.. | T | Chimie physique |
| BROSSEL..... | T | Physique atomique |
| BUSER ..... | T | Physiologie comparée |
| CAMUS..... | T | Physio. végé. |
| CASTAING..... | T | Physique II thermo (Orsay) |
| CURIEN ..... | T | Minéralo & cristal |
| MOYSE ..... | T | Physio. végé. (Orsay). |
| Mme CHARNIAUX-COTTON..... | T | Evolution des êtres organisés |
| POSSOMPES... | T | Zoologie |
| PULLMANN.... | T | Chimie quantique |
| TEILLAC..... | T | Physique nuc. et radioactiv. (Orsay) |
| TONNELAT.... | T | Bio physico chim (Orsay) |
| VILLE..... | T | Econométrie |
| WILLEMART... | T | Chimie PCB |
| DODE..... | T | Chimie (Orsay) |
| FREYMANN.... | T | Recherches physiques |
| GUINOCHET.... | T | Biolo végé SPCN (Orsay) |
| ROLLET..... | T | Chimie minérale |
| Mle JOSIEN.... | T | Chimie SPCN |
| CHEVALLEY... | T | Géométrie algébrique et théorie des groupe |
| ARNOULT..... | T | Electronique Orsay |
| CHAPELLE.... | T | Physique I (Orsay) |
| DELANGE..... | T | Mathématiques I (Orsay) |
| DENY..... | T | Mathé. géné. (Orsay) |
| GERMAIN..... | T | Mécanique théorique des fluides |
| LUCAS ..... | T | Géologie |
| ALLARD..... | T | Chimie physique |
| BERTHELOT... | T | Physique des particules fondamentales (Orsay) |
| BRICARD..... | T | Météor et physique de l'atmosphère |
| Mme ALBE FESSARD | T | Psycho physio |
| FRIEDEL..... | T | Physique des solides (Orsay) |
| M. JULIA..... | T | Etudes des moléculaires complexes |
| LENDER..... | T | Biologie animal SPCN Orsay |
| MAGAT..... | T | Physico chimie des radio éléments |
| Melle QUINTIN.. | T | Electrochimie |
| MONOD..... | T | Chimie du métabolisme |
| BENOIT..... | T | Physio animale Orsay |
| DE POSEEL..... | T | Analyse numérique |
| CHARLOT..... | T | Chimie analytique |
| LEMEE..... | T | Ecologie végétale Orsay |
| GUERIN..... | T | Chimie MPC Orsay |
| CHATELET..... | T | Chimie PCB |
| JEAN..... | T | Physio nucléaire Orsay |
| MATTLER..... | T | Physique SPCN |
| BERGERARD... | T | Zoologie Orsay |
| BERTEIN..... | T | Electronique Orsay |
| BOUISSIERES... | T | Radiochimie |
| Mme COUTURE | T | Thermo et méca physique |
| ELLEMBERGER | T | Géologie des grandes régions du globe (Orsay) |
| FRANC..... | T | Biologie animale PCB |
| SCHNELL..... | | Botanique tropicale |
| STLKOWSKI..... | T | Physiologie végétale |
| ACHER..... | T | Chimie biologiques |
| BAUDOIN..... | T | Biologie animale PCB |
| BEAUMONT..... | | Biologie animale SPCN |
| BLAMONT..... | | Géophysique ionosphère |
| BOUREAU..... | T | Botanique |
| CURIE D..... | | Physique MGP |
| DURAND DELGA | T | Géologie |
| FREON..... | T | Chimie organique Orsay |
| HELLER..... | T | Physiologie végétale |
| TORTRAT..... | T | Calcul des probabilités |
| CAILLEUX..... | T | Géologie SPCN |
| MAGNAN..... | | Physique électricité |
| DAUDEL..... | T | Mécanique ondulatoire appli à la chimie théo & à la phy nucléaire. |
| Mle FOURCROY. | | Biologie végétale SPCN |

| | | |
|---|---|---|
| Mme CHOQUET BRUHAT | | Mécanique analytique et méca céleste |
| Mle VEIL | T | Physiologie générale |
| LWOFF | T | Microbiologie |
| SIESTRUNCK | T | Méca phys & experimentale |
| LACOMBE | T | Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay) |
| BROCHARD | T | Physique PCB (Orsay) |
| CABANNES | T | Mécanique générale |
| LESIEUR | T | Math I (Orsay) |
| MAZET | T | Méca géné (Orsay) |
| CAIRE | | Géogra physique et géo dynamique |
| COMOLET | T | Méca des fluides |
| CORABOEUF | T | Physio animale (Orsay) |
| DELLOUE | T | Physique de l'exosphère |
| GORENFLOT | | Botanique II (Orsay) |
| HOUILLON | | Biologie animale PCB |
| JULLIEN J. | | CHIMIE SPCN (Orsay) |
| MALGRANGE | T | Technique mathé de la phys. (Orsay) |
| OLIVIER | | Antrophologie |
| NOZERAN | T | Botanique II (Orsay) |
| BLANC-LAPIERRE | T | Physique ENS (Orsay) |
| CHEVAUGEON | T | Botanique (Orsay) |
| KAHANE | T | Mathématiques (Orsay) |
| SAMUEL | T | Math ENS féminines |
| KOURGANOFF | T | Astronomie (Orsay) |
| THIRY | T | Méca céleste |
| ABELES | | Physique SPCN |
| AMAT | T | Physique PCB |
| AUBOIN | T | Géologie |
| Mme BENOIT-GUEUTAL | T | Physique nucléaire et radioactivité (Orsay) |
| BOUGIS | | Biologie marine Villefranche/mer |
| BRUHAT | T | Math MPC |
| BRUNN | T | Géologie historique Orsay |
| CHABRAL | T | Physique MGP (Orsay) |
| DEHEUVELS | T | Math propé |
| D'ESPAGNAT | T | Physique théorique (Orsay) |
| FURON | T | Géologie SPCN |
| Mme GANS | T | Génétique |
| GENEVES | | Biologie végétale PCB |
| GUILBERT | | Physique CUS Orléans |
| HUPE | T | Pétrographie |
| HOLLANDE | T | Bio. géné. |
| LIONS | T | Analyse numérique |
| HAITTE | T | Chimie PCB |
| MEYER | | Physique propé |
| NICOLAS | | Géologie appliquée |
| PANIGEL | | Biologie générale |
| RAVIER | | Pétrographie |
| ROSEAU | T | Méca théorique des fluides |
| ROUBINE | | Electronique |
| SILBER | T | Chimie PCB |
| UEBERSFELD | T | Electronique |
| YVON | T | Théories physiques |
| HERVE | T | Mathématiques |
| NERON | T | Math MPC (Orsay) |
| Mme PECKER WIMEL | T | Astrophysique |
| BALKANSKY | | Physique MPC |
| LE CORRE | T | Electricité |
| DELCROIX | T | Physique théorique (Orsay) |
| GOURDIN | T | Physique théorique (Orsay) des hautes énergies |
| LEHMANN | T | Phys exp des hautes énergies |
| NATAF | T | Physique nucléaire et radioactivité (Orsay). |
| ECHALIER | | Biologie animale PCB |
| BARRAUD | | Physiol. cellulaire |
| LIORET | | Physiologie végé Orsay |
| DARS | | Géologie structurale & géol. appli. |
| CAMEFORT | T | Botanique ( agrégation) |
| VICHNIEWSKY | T | Mécanique industrielle |
| BLAQUIERE | | Electronique (Orsay) |
| ARNOUS | T | Physique théorique |
| TATIBOUET | | Chimie (CSU Orléans) |
| MALL | T | Math propé (Orsay) |
| GAUDEMAR | | Chimie propé |
| PEREZ Y JORBA | | Physique Exp des Hautes énergies (Orsay) |
| DAVID | T | Chimie (agrégation Orsay) |
| BROUSSE | T | Mécanique théorique |
| ROSCH | T | Astronomie |
| GUY | T | Physique expérimentale |
| LAZARD | | Math MPC |
| MOREL Pierre | | Physique MPC |
| ARSAC | | Programmation |
| LEFEBVRE | | Chimie MPC |
| CHAPEVILLE | | Biochimie |
| BENOIT | | Physique CPEM |
| RIO | | Chimie CPEM |
| JAUZEIN | | Géologie ENS |
| PREVOST Geor | | BV CPEM |
| FAVARD P. | | BA CPEM |
| VILKAS | | Chimie CPEM |
| Mle PICINI | | Chimie CPEM |
| LEQUEUX | | Astronomie |
| COHEN TANNOUDJI | | Physique MPC |
| TAVERNIER | | Physique CPEM |
| Mme ROIZEN | | " " |
| DURAND M. | | BA SPCN |
| PASCAUD | | Physiologie |
| Mme PETIT | | BA CPEM |
| BROUSSE | | Géologie Orsay |
| CAGNIAC | | Physique agrégation Orsay |
| LEBERRE | | Zoologie (Orsay) |
| SCHEFFER | | Microbiologie (Orsay) |
| de GENNES | | Physique des solides (Orsay) |
| RIOU | | Physique nuclé exp Orsay |
| CLAUSER | | Chimie biol. Orsay |
| CHEVALIER | | Physio animale Orsay |
| JANCOVICI | | Physique atomique Orsay |
| FALK-VAIRANT | | Physique nucléaire Orsay |
| FETIZON | | Chimie propé Orsay |
| CERF | | Mathématiques Orsay |

Secrétaire général..... R. POULAIN

A Monsieur Charles PREVOST

Professeur de Chimie à la Faculté des Sciences de Paris.

qui a bien voulu me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse.

A Monsieur Maurice-Marie JANOT

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris.

A Monsieur Marcel FETIZON

Maître de Conférence à la Faculté des Sciences d'Orsay.
Maître de Conférence à l'Ecole Polytechnique.

qui ont accepté de juger ce travail.

En hommage de respectueuse gratitude.

A Monsieur Maurice-Marie JANOT

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Membre de l'Académie Nationale de Médecine,

Directeur de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles du Centre National de la Recherche Scientifique.

qui m'a fait l'honneur de m'acceuillir dans son laboratoire et m'a prodigué tant de marques d'intérêt.

En témoignage de respectueuse et profonde gratitude.

A Monsieur Robert GOUTAREL

Directeur Scientifique au Centre National de la Recherche Scientifique

Sous-Directeur de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles du Centre National de la Recherche Scientifique

qui n'a cessé de me guider dans ces recherches en me faisant profiter de sa très grande compétence en Chimie végétale.

En témoignage de profonde reconnaissance et de respectueuse affection.

A Monsieur Xavier LUSINCHI

Maître de Recherche au Centre National de la Recherche Scientifique

qui m'a fait bénéficier de ses conseils, de son aide constante et de son soutien amical

En témoignage de profonde gratitude.

A MES PARENTS

En témoignage de profonde affection.

# INTRODUCTION

Les alcaloïdes sont considérés comme les principes les plus actifs des plantes qui les contiennent, aussi est-il naturel que depuis leur découverte, ils retiennent l'attention des pharmaciens. C'est ainsi que, depuis de nombreuses années, au laboratoire de Pharmacie galénique de la Faculté de Pharmacie de Paris, M. le Professeur M.-M. JANOT, en collaboration avec M. R. GOUTAREL, s'est spécialisé dans leur étude.

Depuis 1961, un nouveau centre de recherche s'est ouvert, toujours sous la direction de M. M.-M. JANOT à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles du C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette. Là, M.R. GOUTAREL, Directeur Scientifique au C.N.R.S., a constitué une nouvelle équipe en pleine production scientifique.

Conjointement à l'étude systématique des alcaloïdes de plantes de la famille des Apocynacées, M. R. GOUTAREL a dirigé ses investigations vers d'autres familles botaniques et il m'a fait l'honneur de me confier l'étude chimique du Panda oleosa Pierre de la famille des Pandacées. Notre camarade X. Monseur avait isolé de cette plante, en 1959, un alcaloïde nommé pandamine, et c'est l'étude de la structure de la pandamine qui fait l'objet principal de ce travail.

Le plan adopté est le suivant :

PARTIE THEORIQUE

- Généralités botaniques sur le Panda oleosa Pierre
- Extraction des alcaloïdes du Panda oleosa.
- Etude de la structure de la pandamine :

I - Groupements fonctionnels

II - Etude par dégradation totale et première hypothèse de structure.

A. Fusion alcaline

B. Dégradation par hydrolyse

1) hydrolyse acide

2) hydrolyse alcaline

Première hypothèse de structure.

III - Détermination de la structure réelle

A. Hydrolyse acide partielle de la pandamine

B. Hydrolyse alcaline et acide de la désoxopandamine

C. Spectre de masse de la pandamine

IV - Stéréochimie

PARTIE EXPERIMENTALE

CONCLUSION

Nous ne saurions commencer cet exposé sans remercier

M. J. RENARD, Directeur des laboratoires Omnium Chimique, à Bruxelles, ainsi que M. J. MAINIL, Directeur Scientifique, qui nous ont procuré les écorces de racine de Panda oleosa, utilisées dans ce travail ; M. X. MONSEUR qui nous a aidée dans l'extraction des alcaloïdes.

M. A. HOREAU, Professeur au Collège de France, pour la détermination de la configuration absolue du carbone portant la fonction alcool de la pandamine.

M. F.X. JARREAU, pour de précieux conseils et d'utiles discussions sur la structure de la pandamine.

M. Z. WELWART, pour des remarques et des suggestions concernant le mécanisme des réactions.

M. J. PARELLO, Mme L. ALLAIS et M. U. SCHEIDEGGER, pour l'exécution et l'interprétation des spectres de résonance magnétique nucléaire.

M. W. VETTER et M. BARBER, qui ont éxécuté les spectres de masse de la pandamine et de l'acétylpandamine, à Manchester, à l'aide du spectrographe MS-9.

Le service de spectrographie infra-rouge et le service de spectrographie de masse de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette.

Le service de Microanalyse, dirigé par Mlle C. MULLER.

Le Centre National de la Recherche Scientifique, qui permit matériellement la réalisation de ces travaux et M. le Professeur LE HIR qui accepta d'être notre "parrain".

Nous tenons à remercier également les membres des laboratoires de Pharmacie Galénique de la Faculté de Pharmacie de Paris et de l'Institut des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette :

M. J. LE MEN, Professeur à l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie de Reims.

M. J. POISSON, Maître de Conférence à la Faculté de Pharmacie de Paris.

MM. A. CAVE, J. LEVY, M. PLAT, F. PUISIEUX.

Mme et Mlles C. CONREUR, M. CHOIX, assistante, A.M. BUI, J. GOSSET, D. HERLEM, A. HUSSON, F. KHUONG-HUU, M. LEMAITRE, M.J. MAGDELEINE, A. MILLIET, L. OLIVIER.

MM. E. MOCZAR, N.G. BISSET, N. D. TAM, J.P. ALAZARD, R. BEUGELMANS, A. CAVE, P. DEVISSAGUET, H.P. HUSSON, Q. KHUONG-HUU, M. KOCH, M. LEBOEUF, P. LONGEVIALLE, P. MILLIET, C. MONNERET, A. PICOT, P. POTIER, J. POUSSET, M. TRUONG-HO, Y. YASSI.

qui à des titres divers nous ont aidée et conseillée.

oOo

# PARTIE THEORIQUE

## GENERALITES BOTANIQUES SUR LE PANDA OLEOSA PIERRE

Le Panda oleosa Pierre (1) est, jusqu'à présent, l'unique espèce représentant la famille des Pandacées qui fait partie des Angiospermes Dicotylédones.

Dans la dernière édition du "Syllabus der Pflanzenfamilien" de ENGLER (2), cette famille est placée dans l'ordre des Célastrales à côté des Célastracées, ce qui suit un mode de classification préconisé par HUTCHINSON (3).

Cependant, des travaux actuellement en cours (4) tendent à montrer que les caractères des Pandacées se rapprochent beaucoup de ceux des Euphorbiacées. Les deux genres Microdesmis et Galearia qui appartiennent à cette dernière famille semblent être très voisins du genre Panda et il a été proposé de les faire entrer dans la famille des Pandacées, qui serait dans ces conditions classée à côté des Euphorbiacées parmi les Géraniales dans le système de ENGLER ou parmi les Euphorbiales dans le système de HUTCHINSON.

Le Panda oleosa est un grand arbre de 10 à 15 mètres de haut dont l'habitat est limité aux forêts ombrophiles de l'Afrique occidentale (2). On peut en trouver une description botanique précise dans la Flore du Congo Belge et du Ruanda-Urundi (5).

Les caractères essentiels sont les suivants :

Feuilles alternes, simples, à stipules petites et caduques.

Fleurs dioïques :

- inflorescences en racèmes caulinaires solitaires ou fasciculés à rachis de 15 à 35 cm de long, portant des fleurs depuis la base.

- fleurs mâles 2-5 fasciculées, calice cupulaire petit, corolle à 5 pétales valvaires, androcée à 10 étamines en deux verticilles, l'intérieur étant plus court que l'extérieur, disque intrastaminal peu développé, ovaire rudimentaire.

- fleurs femelles solitaires, calice comme dans les fleurs mâles, corolle à 5 pétales plus ou moins imbriqués, gynécée à ovaire supère, 3-4 loculaire, avec 1 ovule orthrotrope et pendant par loge, stigmates 3-4 subsessiles.

Fruit drupacé à mésocarpe bien développé, endocarpe épais très dur, fortement alvéolé et lacuneux.

Graines 3-4 aplaties, triangulaires, courbes, à albumen oléagineux. Ces graines sont comestibles et fournissent une huile que préparent les indigènes (2).

oOo

## EXTRACTION DES ALCALOIDES DU PANDA OLEOSA

La partie de la plante utilisée est l'écorce de racine du Panda oleosa, les autres parties de cette plante étant moins riches en alcaloïdes totaux.

Le principe de la méthode d'extraction qui a été employée consiste à obtenir d'abord un extrait brut des écorces préalablement alcalinisées, au moyen d'un solvant organique, par épuisement à l'appareil de Soxhlet. Les alcaloïdes sont ensuite séparés des autres produits extraits simultanément par passage en phase aqueuse dans une solution d'acide sulfamique, les sulfamates d'alcaloïdes étant en général assez solubles dans l'eau. De cette solution sulfamique les bases alcaloïdiques sont extraites de nouveau, après alcalinisation, par un solvant organique.

A partir de 17 kilog d'écorces de racines pulvérisées, nous avons pu obtenir, par cette méthode qui s'est révélée particulièrement favorable ici, 55 g d'alcaloïdes blancs cristallisés (Rendement 0,3 %). Le solvant d'extraction est l'éther, aussi bien pour l'épuisement à l'appareil de Soxhlet que pour la réextraction, et les alcaloïdes bruts cristallisent rapidement au cours de la concentration finale.

Ce sont ces alcaloïdes bruts, nommés "pandamine", qui ont été utilisés par O. BLANPIN et X. MONSEUR pour une étude pharmacodynamique (6).

### PURIFICATION

La chromatographie sur couche mince de silice indique la présence, dans les alcaloïdes bruts, de deux bases donnant deux taches très voisines, la base la moins polaire paraissant dominer légèrement.

Aucune séparation ne peut être obtenue par chromatographie sur colonne d'alumine. Sur colonne de silice, la séparation est très partielle : on élue en tête, un mélange enrichi en produit le moins polaire et ensuite, un mélange de plus en plus riche en deuxième alcaloïde.

Le spectre IR des bases brutes présentait une bande hydrogène mobile à 3300 $cm^{-1}$ et une bande à 1090 $cm^{-1}$, l'ensemble étant attribuable à une fonction alcool. L'acétylation au moyen de l'anhydride acétique dans la pyridine conduit effectivement à un mélange de dérivés O-acétylés qui donne également sur chromatoplaque deux taches, la tache correspondant au produit le moins polaire étant de même plus intense.

Ce produit d'acétylation brut est chromatographié sur silice, chaque fraction étant analysée par chromatographie sur plaque. On élue alors, en tête de chromatographie, par du chlorure de méthylène contenant 2 % de méthanol, un mélange qui ne renferme que de faibles quantités du dérivé le plus polaire et qui, après une deuxième chromatographie, fournit le dérivé le moins polaire à l'état pur.

Les autres fractions constituées par des mélanges en proportions variables des deux composés acétylés sont soumises ensuite à de nouvelles chromatographies.

Le dérivé acétylé pur, correspondant au produit le moins polaire, fournit par saponification une base à laquelle nous avons donné le nom de pandamine, dont la pureté est contrôlée par chromatographie sur plaque. La pandamine donne une seule tache correspondant bien à la tache la moins polaire du mélange initial.

La deuxième base, ou pandaminine, n'a pu jusqu'à présent être obtenue pure. Il résulte cependant de l'examen des constantes physiques (IR, NMR) des fractions enrichies en pandaminine, ainsi que des données analytiques, que le deuxième alcaloïde a une structure très voisine de celle de la pandamine et doit être considéré comme un isomère de celle-ci.

oOo

## ETUDE CHIMIQUE DE LA PANDAMINE

La pandamine se présente sous la forme d'une poudre cristalline blanche. Elle fond à 256° et présente un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$ = -103° ($CHCl_3$, c = 0,5). Elle est très soluble dans le méthanol, peu soluble dans le chloroforme, l'acétone, l'acétate d'éthyle, très peu soluble dans le benzène et l'éther. Elle peut être cristallisée dans l'acétate d'éthyle et se sublime facilement à 220° sous 0,01 mm de mercure.

L'analyse élémentaire de la pandamine est en accord avec la formule brute $C_{31}H_{44}O_5N_4$ correspondant à un poids moléculaire de 552,69. Ce poids moléculaire calculé a été confirmé :

1. - par le spectrogramme de masse obtenu avec un appareil MS-9 à introduction directe sur lequel on observe un pic moléculaire $M^+$ = 552.

2. - par titration de la fonction basique : par microtitrimétrie dans le méthylcellosolve, l'équivalent moléculaire trouvé pour la pandamine monobasique est 567 et par anhydrotitrimétrie (titrage par l'acide perchlorique en milieu acétique), il est de 547.

## I - GROUPEMENTS FONCTIONNELS

### A - ETUDE CHIMIQUE

La pandamine fournit un monochlorhydrate F = 235° (déc.) $[\alpha]_D$ = -77° (méthanol c = 1) de formule brute $C_{31}H_{44}O_5N_4$, HCl, $H_2O$.

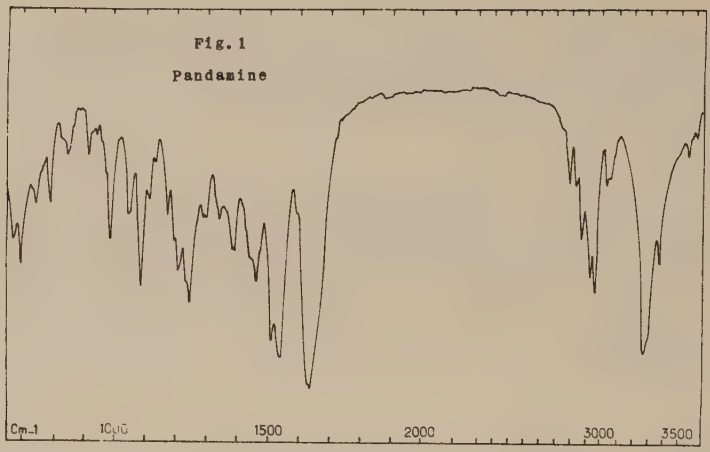



Fig. 1

Pandamine

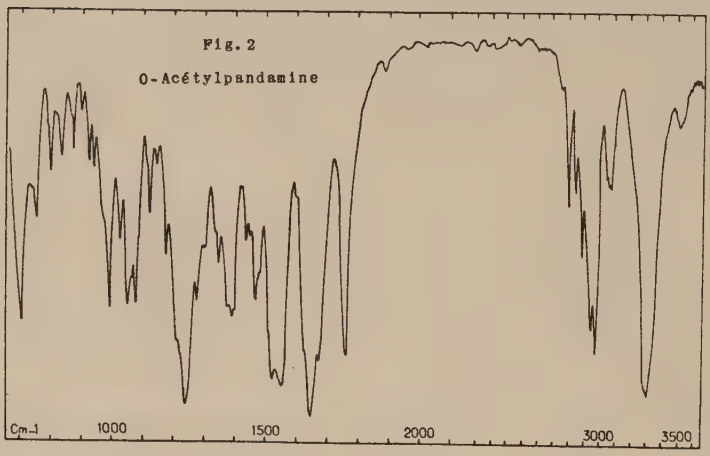



Fig. 2

O-Acétylpandamine

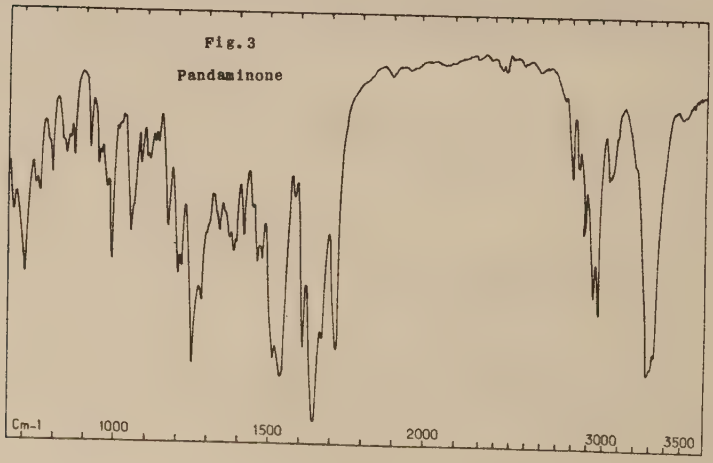



Fig. 3

Pandaminone

L'acétylation (anhydride acétique/pyridine) conduit à une O-acétylpandamine F = 305°, $[\alpha]_D$ = - 98° ($CHCl_3$, c = 0,5). A la O-acétylpandamine, de formule brute $C_{33}H_{46}O_6N_4$, correspond un monochlorhydrate F = 280° (déc.), $[\alpha]_D$ = - 89°6 (méthanol, c = 1), de formule brute $C_{33}H_{46}O_6N_4$, HCl, $2H_2O$.

La présence d'une fonction alcool est confirmée et sa nature secondaire démontrée par oxydation chromique de la pandamine en solution acétonique (7), conduisant à une cétone, la pandaminone, F = 304°, $[\alpha]_D$ = -104° (dioxanne, c = 1), de formule brute $C_{31}H_{42}O_5N_4$.

Le caractère basique de la pandamine, extractible en milieu alcalin, exclut la présence d'une fonction carboxylique libre.

Des résultats négatifs ont établi, d'autre part, l'absence de double liaison hydrogénable dans l'alcool en présence de platine et l'absence de fonction phénolique libre : la pandamine ne réagit pas avec le diazométhane. Enfin, l'acétylation dans la pyridine ne conduit qu'à la formation d'un dérivé O-acétylé, ce qui élimine la possibilité d'une fonction amine primaire ou secondaire.

## B - ETUDE SPECTRALE

Spectres UV :

Le spectre UV de la pandamine dans l'alcool présente une absorption continue décroissante de 210 à 330 mμ avec deux maximums peu accentués à 230 mμ ($\log \varepsilon$ 3,59) et à 277 mμ ($\log \varepsilon$ 1,80).

Le spectre UV de la pandaminone dans le même solvant présente un maximum net à 266 mμ ($\log \varepsilon$ 3,87) en accord avec la valeur moyenne des maximums décrits pour une cétone en α d'un noyau aromatique (8).

Spectres IR (KBr) :

On observe sur les spectres de la pandamine (fig. 1) et de ses dérivés acétylé (fig. 2) et cétonique (fig. 3) :

- un ensemble de bandes à 3300, 1650 et 1540 $cm^{-1}$ qui peut être attribué à des fonctions amides -CO-NH-

- trois bandes à 2780, 2830 et 2880 $cm^{-1}$, pouvant correspondre à la présence d'un groupe $N(CH_3)_2$.

- une bande faible à 3050 $cm^{-1}$, attribuable à des vibrations C-H benzéniques.

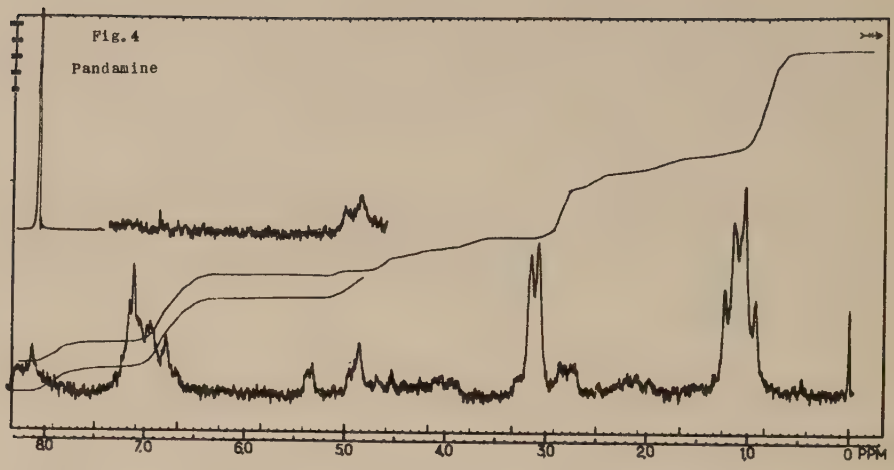


Fig. 4
Pandamine
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0 PPM

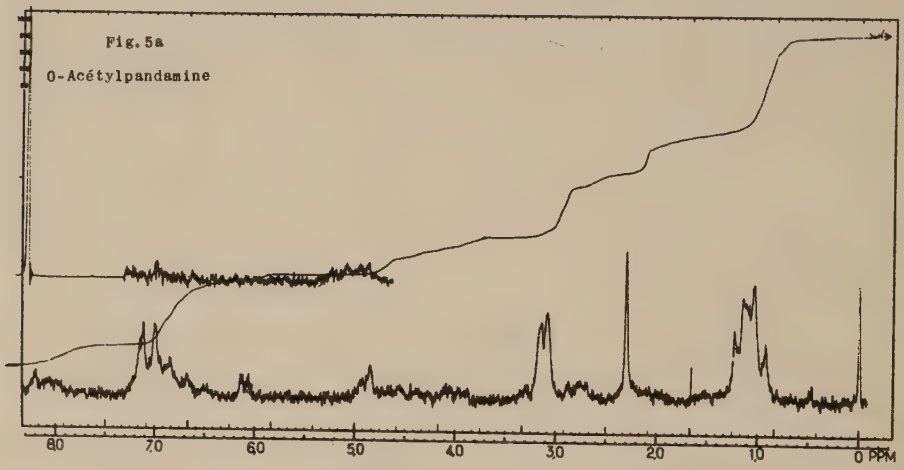


Fig. 5a
O-Acétylpandamine
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0 PPM

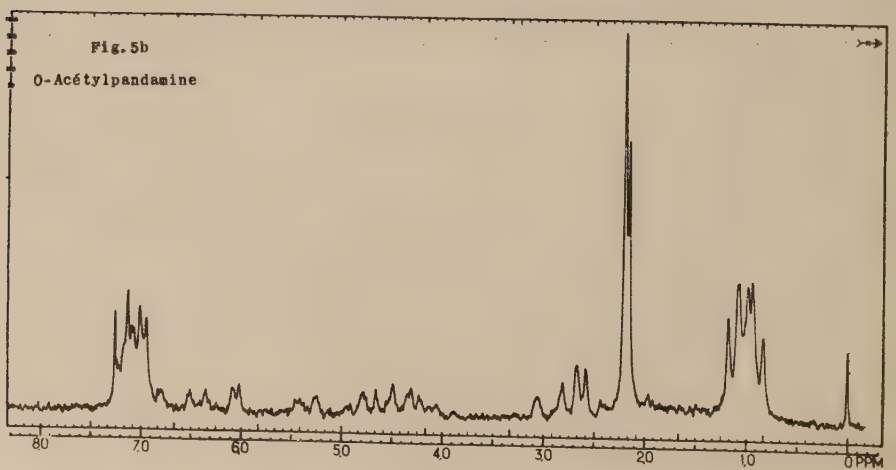


Fig. 5b
O-Acétylpandamine
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0 PPM

Les spectres IR de la pandamine et de la pandaminone présentent une bande forte à 1250 $cm^{-1}$, généralement attribuable à un groupe =C-O-. En l'absence de fonction carboxylique, de fonction ester ou de fonction phénol libre, cette bande peut correspondre à la présence d'une fonction éther de phénol.

On observe, en outre, dans le spectre IR de la pandamine, une bande à 1090 $cm^{-1}$ qui peut être attribuée à la vibration C-O de la fonction alcool. Cette absorption est absente dans le spectre de la pandaminone, par ailleurs caractérisée par l'apparition de la bande carbonyle à 1720 $cm^{-1}$.

Le spectre IR de l'acétylpandamine présente bien les bandes caractéristiques d'une fonction ester à 1765 $cm^{-1}$ et à 1240 $cm^{-1}$, cette dernière bande large recouvrant la bande éther de phénol à 1250 $cm^{-1}$.

Spectres de RMN :

Le spectre de RMN de la pandamine (fig. 4), n'a pu être réalisé que dans l'acide trifluoroacétique, cet alcaloïde étant peu soluble dans le deutérochloroforme. L'intégration totale est peu précise et donne 42 $\pm$ 3 protons, valeur qui est cependant bien en accord avec la formule brute $C_{31}H_{44}O_5N_4$.

On trouve :

- entre 0,8 et 1,3 ppm, les signaux de 13 protons pouvant correspondre au plus à quatre groupes méthyles aliphatiques.

- à 3,05 et à 3,13 ppm, deux singulets, soit six protons, qui peuvent correspondre à 2 $N-CH_3$.

- à 5,33 ppm un signal ayant l'apparence d'un doublet, correspondant à un proton.

- entre 6,6 et 7,3 ppm, les signaux de 9 à 10 protons de caractère aromatique.

Le spectre de RMN de l'acétylpandamine dans l'acide trifluoroacétique (fig. 5a), montre le signal du groupe $O-CO-CH_3$ sous forme d'un singulet, à 2,25 ppm. Les autres signaux sont identiques à ceux du spectre de la pandamine à l'exception du proton à 5,33 ppm. Celui-ci s'est déplacé à 6,10 ppm. Ce déplacement permet d'interpréter les signaux à 5,33 et à 6,10 ppm respectivement comme ceux d'un hydrogène en $\alpha$ d'un groupement OH et d'un groupement acétyle.

Le spectre de RMN de l'acétylpandamine a pu être réalisé également dans le deutérochloroforme (fig. 5b). Les six protons des groupes $N-CH_3$ donnent un seul pic à 2,20 ppm.

Le spectre de RMN de la pandaminone dans l'acide trifluoroacétique ne présente pas de signal entre 5 et 6 ppm.

Les données précédentes permettent de postuler pour la pandamine les fonctions suivantes :

- sur les quatre atomes d'azote de la molécule, l'un est un azote basique tertiaire. La présence, dans les spectres IR de la pandamine et de ses dérivés de trois bandes d'absorption vers 2800 $cm^{-1}$ et dans les spectres de RMN des signaux de 6 protons pouvant correspondre à des groupements méthyles portés par un atome d'azote, suggère l'existence d'un groupement diméthylamino. (Il convient de remarquer que les deux pics $N-CH_3$, distincts sur les spectres de RMN effectués dans l'acide trifluoroacétique sont confondus sur le spectre de l'acétylpandamine exécuté dans le deutérochloroforme).

- les trois autres atomes d'azote et trois atomes d'oxygène sont vraisemblablement engagés dans des fonctions amides.

- le quatrième atome d'oxygène est celui d'une fonction alcool secondaire très probablement située en $\alpha$ d'un noyau aromatique ; le dernier est sans doute engagé dans une fonction éther de phénol (bande IR à 1250 $cm^{-1}$).

D'autre part, le squelette de la molécule comporte des méthyles aliphatiques et au moins deux noyaux aromatiques.

## II - ETUDE PAR DEGRADATION TOTALE ET PREMIERE HYPOTHESE DE STRUCTURE.

### A - FUSION ALCALINE DE LA PANDAMINE

L'étude spectrale précédente, si elle a permis de préciser la nature des groupements fonctionnels de la pandamine, n'a donné que peu de renseignements sur le squelette carboné de la molécule ; il n'a pas été possible de rattacher la pandamine à un type d'alcaloïde connu. Nous avons pensé que les premières indications pourraient nous être données par la fusion alcaline. Cette méthode, classiquement utilisée dans l'étude des molécules naturelles, en particulier des alcaloïdes, permet souvent de mettre en évidence certains enchaînements stables du squelette moléculaire (9).

Les produits formés par action à 350° d'un mélange de potasse et de soude sur la pandamine sont séparés en deux fractions :

- une fraction basique volatile.
- une fraction acide fixe.

Fraction basique :

Aucune substance à point d'ébullition élevé ne se condense dans le réfrigérant à air que comporte l'appareil.

Les substances plus volatiles sont recueillies dans une solution d'acide chlorhydrique. Cette solution, évaporée à sec, laisse un résidu de sels, donnant, par cristallisation dans le méthanol, du chlorure d'ammonium, qui est identifié par son spectre IR comparé à celui d'un échantillon de référence.

Les eaux-mères de la cristallisation ont été étudiées par chromatographie sur couche mince. En transposant sur plaque une méthode décrite par W. KELLER-SHIRLEIN (10) pour la chromatographie sur papier, il a été possible de mettre en évidence, par élution avec un mélange phénol-eau et révélation par la ninhydrine, puis par un mélange de ninhydrine et d'acide ascorbique, deux taches de coloration et de $R_f$ identique à ceux de témoins de chlorure d'ammonium et de chlorhydrate de monométhylamine.

Sur un chromatogramme effectué dans les mêmes conditions, mais révélé par le réactif de Dragendorff et l'acide sulfurique, on observe, d'autre part, une tache de même $R_f$ que celle d'un témoin de chlorhydrate de diméthylamine.

- La caractérisation de ces produits basiques : ammoniac, monométhylamine et diméthylamine, à l'exclusion de toute autre amine ou polyamine aliphatique ou aromatique, permet d'éliminer la présence, dans la molécule de pandamine, d'une amine cyclique du type de la pipéridine par exemple, ou d'une polyamine aliphatique stable, comme la spermidine, triamine obtenue au cours de la fusion alcaline de la lunarine, alcaloïde isolé du Lunaria biennis, dont la structure comporte deux fonctions amides (11).

La grande quantité de chlorure d'ammonium isolée provient sans doute d'amines facilement dégradées telles que des $\alpha$-amino-acides formés lors de la rupture de liaisons de type peptidique.

La diméthylamine correspond au groupe diméthylamino basique de la pandamine identifié par les méthodes spectrales.

L'origine de la monométhylamine est moins évidente, la pandamine ne présentant pas de groupement N-méthyl en dehors du groupement diméthylamino. On peut supposer qu'elle se forme, soit par dégradation plus poussée de la diméthylamine, soit par rupture d'une chaîne aminée de type $-\dot{C}_{|}-CH_2-NH_2$ présentant une liaison C-C labile.

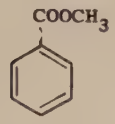
Fraction acide :

Le résidu de la fusion, repris par l'acide chlorhydrique, a été extrait par de l'éther, ce qui a permis d'isoler un mélange d'acide organiques. Ceux-ci, transformés en esters méthyliques par action du diazométhane, ont été étudiés par chromatographie en phase gazeuse.

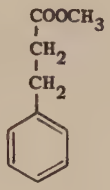
Dans une première étude analytique, la phase stationnaire est constituée de polyesters, dont l'emploi dans l'étude des esters d'acides gras aliphatiques donne les meilleures séparations (12). A coté de pics peu intenses à temps de rétention très courts, le chromatogramme présente trois pics principaux dont les temps de rétention sont voisins de ceux des esters des acides gras en $C_{12}$, $C_{14}$ et $C_{16}$.

Les trois esters correspondant à ces trois pics ont été séparés par chromatographie en phase gazeuse préparative à l'aide de l'appareil Aerograph A 90 P, sur une colonne de même nature que la colonne analytique et de capacité supérieure.

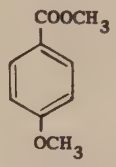
Les esters méthyliques des acides benzoïque 1, phénylpropionique 2 et anisique 3 ont été ainsi obtenus et identifiés par spectrométrie de RMN et spectrométrie de masse. Leurs structures ont été controlées par l'isolement après hydrolyse des trois acides correspondants.




1




2

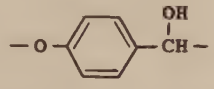



3

— L'examen de la fraction acide établit que les protons aromatiques identifiés sur le spectre de RMN de la pandamine appartiennent à deux noyaux aromatiques distincts non condensés :

- l'acide phénylpropionique et l'acide benzoïque doivent correspondre à deux stades de dégradation d'un fragment portant un noyau aromatique monosubstitué avec une chaîne aliphatique.

- la pandamine ne comportant pas de groupement méthoxy, l'acide anisique dérive vraisemblablement de l'action sur l'acide p-hydroxybenzoïque du diazométhane utilisé au cours de la préparation des esters. L'identification de cet acide est en faveur de l'existence dans la pandamine d'un noyau aromatique paradisubstitué portant une fonction éther de phénol. La présence très probable d'une fonction alcool en $\alpha$ d'un noyau aromatique conduit à envisager l'enchaînement suivant :



— Les renseignements apportés par la fusion alcaline permettent donc de préciser les hypothèses formulées précédemment : en particulier :

- la nature et le type de substitution des noyaux benzéniques

- la nature des fonctions amides qui participent vraisemblablement à un enchaînement peptidique.

Ce dernier résultat nous a conduit à étudier les produits d'hydrolyse acide et alcaline de la pandamine.

## B - DEGRADATION DE LA PANDAMINE PAR HYDROLYSE

### 1 - HYDROLYSE EN MILIEU ACIDE

L'hydrolyse chlorhydrique est la plus généralement utilisée pour l'étude de la structure des polypeptides. Une hydrolyse effectuée à 110° dans l'acide chlorhydrique 6 n pendant 24 heures est généralement suffisante pour libérer au moins partiellement les acides aminés sans que ceux-ci soient racémisés (13, 14, 15). Le mélange d'acides aminés obtenu peut être ensuite analysé par chromatographie sur papier ou sur plaque et révélation par la ninhydrine.

Un essai d'hydrolyse acide de la pandamine effectué en tube scellé par l'acide chlorhydrique 6 n à 110° pendant 24 heures a laissé en partie la pandamine insoluble et intacte.

A 140°, les autres conditions restant les mêmes, l'hydrolyse devient totale ; elle s'accompagne cependant d'une certaine décomposition de la molécule avec formation de produits résineux noirs. L'extraction par de l'éther donne un mélange d'acides non cristallisés. La phase aqueuse, évaporée à sec, laisse un résidu de chlorhydrates.

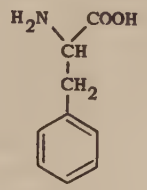
L'analyse par chromatographie sur papier en deux dimensions de ce résidu, selon une méthode décrite par A. L. LEVY et D. CHUNG (16), met en évidence la présence d'une tache unique révélée à la ninhydrine, ayant le même $R_f$ et la même coloration qu'un échantillon de référence de phénylalanine.

Isolément de la phénylalanine 4 : celle-ci a été effectivement isolée à l'état pur du résidu de chlorhydrates de la façon suivante :

- le résidu de chlorhydrates est dissous dans l'eau, alcalinisé à la soude et extrait à l'éther, ce qui permet d'éliminer une petite quantité de composés basiques.

- la solution aqueuse des produits amphotères, contenant également du chlorure de sodium, est passée sur une résine sulfonique qui fixe les ions $Na^+$ et les acides aminés ; ceux-ci peuvent ensuite être élués sélectivement par une solution ammoniacale.

- Le résidu d'évaporation de cette solution, après digestion dans l'alcool absolu, laisse un produit insoluble qui est cristallisé dans un mélange d'alcool et d'eau et fournit de la L-phénylalanine F = 283° (bloc), $[\alpha]_D$ = -35° (eau, c = 1), identique à un échantillon de référence.




4

Cette hydrolyse acide aboutit donc à l'identification d'un seul amino-acide, la L-phénylalanine. Ce résultat établit définitivement la structure peptidique partielle de la pandamine, la phénylalanine étant vraisemblablement liée au reste de la molécule par deux fonctions amides.

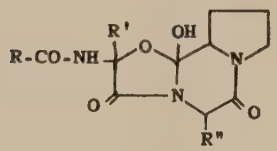
## 2 - HYDROLYSE EN MILIEU ALCALIN.

La décomposition poussée subie par la pandamine en milieu acide nous a amenée à abandonner momentanément ce mode d'hydrolyse pour étudier l'hydrolyse alcaline.

L'hydrolyse en milieu alcalin est d'un usage beaucoup moins général dans l'étude des peptides, car elle présente le désavantage, en plus d'une destruction plus importante des amino-acides (17), de conduire à des produits d'hydrolyse racémisés, par attaque de l'hydrogène mobile porté par le carbone en $\alpha$ de la fonction carboxylique (18). Elle est cependant utilisée lorsque les produits d'hydrolyse sont altérés en milieu acide : peptides contenant du tryptophane par

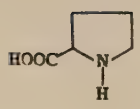
exemple (19). Elle s'est révélée particulièrement efficace dans l'étude de certaines molécules complexes possédant une structure peptidique partielle, en particulier dans l'étude des alcaloïdes de l'Ergot de Seigle, seuls alcaloïdes peptidiques connus jusqu'à présent (20).

Ces alcaloïdes, représentés par la formule globale 5, subissent en milieu acide une décomposition qui ne permet d'isoler que les acides aminés 6 et 7 (21), tandis que l'hydrolyse alcaline dans la soude normale donne l'acide lysergique 8, un acide $\alpha$-cétonique 9 et un peptide dont l'hydrolyse acide conduit aux acides aminés 6 et 7 (22). Pour ces alcaloïdes, l'hydrolyse alcaline, en présence d'un équivalent de potasse en milieu hydroalcoolique, s'est révélée particulièrement maniable et a permis d'obtenir l'amide de l'acide lysergique 10 ainsi qu'un peptide ayant gardé une partie de l'enchaînement primitif de la molécule 11 (23).

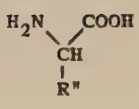


5

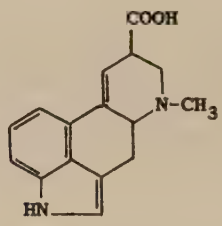
R = reste d'acide lysergique
R' = chaîne aliphatique
R" = chaîne aliphatique ou aromatique



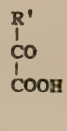
6



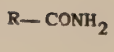
7



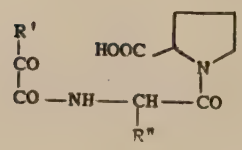
8
(acide lysergique)



9



10



11

Les essais d'hydrolyse effectués sur la pandamine en solution dans un mélange de méthanol et d'eau (l'insolubilité étant totale dans une solution aqueuse alcaline) ont montré que cet alcaloïde n'est pas attaqué dans les conditions utilisées pour l'Ergot. Après 24 heures de reflux dans la soude normale, la pandamine reste inaltérée, mais elle est totalement hydrolysée après 20 heures de reflux dans la soude environ 4 n.

Les produits de cette hydrolyse, après distillation du méthanol sous pression réduite sont séparés en trois fractions :

- Fraction 1 : Cette fraction est obtenue par simple extraction à l'éther.
- Fraction 2 : Cette fraction est obtenue ensuite par extraction après acidification par l'acide chlorhydrique.
- Fraction 3 : Cette fraction est constituée par la phase aqueuse résiduelle.

Fraction 1 : produits basiques.

Le résidu de l'extraction éthérée est cristallisé. Par chromatographie sur couche mince, aucune tache n'est révélée par la ninhydrine et une seule tache de coloration violet-mauve est mise en évidence par le réactif de Dragendorff et l'acide sulfurique. Le point de fusion du résidu cristallin est étalé entre 100 et 130°. Par cristallisation dans l'acétone, on obtient avec un rendement faible un produit à point de fusion net, F = 160°, et qui présente un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = +9°$ ($CHCl_3$, c = 1). Son analyse élémentaire correspond à la formule brute $C_8H_{18}ON$.

Le spectre IR de ce composé, effectué en suspension dans le Nujol, présente des bandes à 3335, 3150, 1675 et 1630 $cm^{-1}$, pouvant être attribuées à une fonction amide primaire. L'apparition dans le spectre effectué en solution d'une série de bandes situées entre 3520 et 3180 $cm^{-1}$ et caractéristiques d'un groupe $NH_2$ confirme cette hypothèse, les bandes amide I et II se retrouvant à 1695 et 1610 $cm^{-1}$. Le caractère d'amide du groupe $NH_2$ est par ailleurs démontré par un essai négatif d'acétylation.

En outre, on observe sur le spectre en solution des bandes situées à 2780, 2830 et 2880 $cm^{-1}$ qui sont celles d'un groupement $N(CH_3)_2$.

L'examen du spectre de RMN (fig. 8) confirme ces premiers éléments et permet de postuler la structure du produit. Ce spectre présente, en effet,

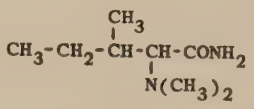
- à 2,30 ppm, un singulet correspondant à 6 protons, attribuable à un groupe $N(CH_3)_2$.

- à 2,50 ppm, le signal du proton en $\alpha$ du groupe diméthylamino, apparaissant sous forme d'un doublet (J = 6 c/s).

- entre 0,8 et 1,1 ppm, les six protons de 2 méthyles aliphatiques : l'ensemble des signaux observés exclut la présence d'un enchaînement isopropyle $(CH_3)_2$-CH-, mais est en accord avec la présence d'un enchaînement butyle secondaire $CH_3$-$CH_2$-CH($CH_3$)-.

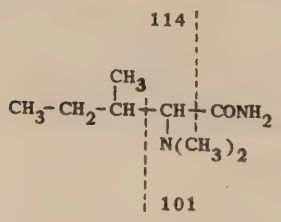
Enfin, à 6,2 ppm, un pic large, correspondant à 2 protons, peut être attribué au groupement $NH_2$ identifié sur le spectre IR.

Ces résultats sont compatibles avec la structure du N-diméthyl-isoleucinamide 12.



12

Cette structure est confirmée par spectrométrie de masse (fig. 9). Bien que le pic moléculaire ne soit pas observé, le spectre présente un pic intense m/e = 114 et un pic d'intensité plus faible m/e = 101, homologues des pics m/e = 114 et m/e = 130 observés par K. BIEMANN (24a) pour l'ester éthylique de la N-diméthyl-leucine et qui correspondent à une coupure classique pour les esters d'acides $\alpha$-aminés.



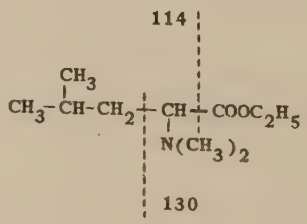
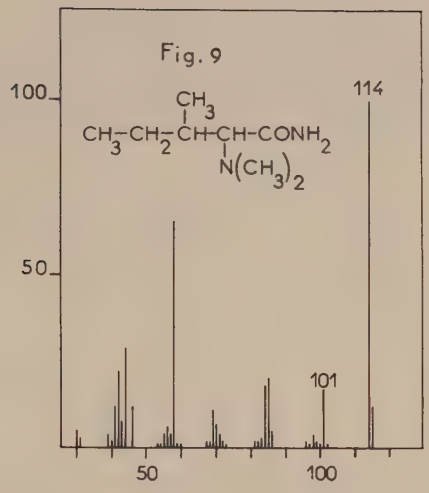



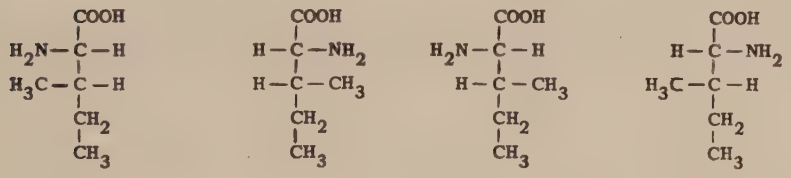
Fig. 9




Stéréochimie :

Le N-diméthyl-isoleucinamide possède deux carbones asymétriques et peut donc se présenter sous deux formes diastéréoisomères correspondant à l'isoleucine et à l'alloisoleucine. Les conditions de l'hydrolyse alcaline étant suffisamment énergiques pour provoquer une épimérisation de l'hydrogène en $\alpha$ de la fonction amide, le produit de l'hydrolyse est évidemment constitué par un des deux mélanges correspondant aux quatre isomères possibles de l'isoleucine :

- L-iso, D-alloiso
- ou D-iso, L-alloiso.

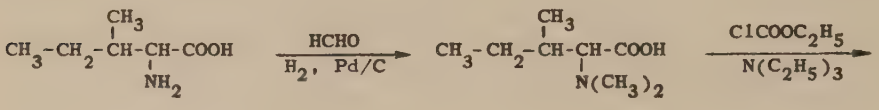



**ISOLEUCINES (Projections de Fischer)**

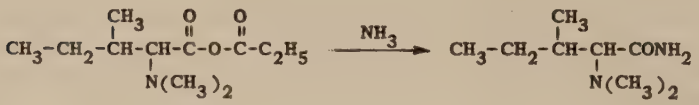
Ce mélange, non séparable par chromatographie sur plaque, présente un point de fusion étalé. Sur son spectre de RMN, le signal du proton en $\alpha$ du groupe $N(CH_3)_2$ vers 2,5 ppm a l'allure générale d'un quadruplet dû vraisemblablement à la superposition des deux doublets correspondant à chacun des diastéréoisomères, qui n'apparaissent pas exactement à la même fréquence. Par contre, le produit 12 obtenu par cristallisation dans l'acétone est un des deux diastéréoisomères à l'état pur.

Synthèse :

la synthèse du N-diméthyl-isoleucinamide, produit encore inconnu, a été réalisée à partir d'un mélange commercial de L-isoleucine et de D-alloisoleucine, selon le schéma suivant :




13 14




15 12

L'isoleucine 13 est diméthylée à l'azote par hydrogénation catalytique en présence de formaldéhyde, d'après une technique décrite par R. E. BOWMAN (25) et donnée pour laisser intacte la configuration du carbone portant l'azote. La N-diméthyl-isoleucine obtenue 14, qui ne réagit pas avec la ninhydrine, fond à 115-120°. V. M. INGRAM (26) décrit un point de fusion de 135° pour un produit préparé par la même méthode à partir d'une isoleucine dont la stéréochimie n'est pas précisée, le terme d'isoleucine servant parfois à désigner un mélange de diastéréoisomères. Le spectre de RMN du produit obtenu présente le signal du groupe $N(CH_3)_2$ à 2,90 ppm et à 3,47 ppm un multiplet correspondant au proton en $\alpha$ du groupe $N(CH_3)_2$ et caractéristique d'un mélange de diastéréoisomères.

L'amide 12 a été préparé par l'intermédiaire de l'anhydride mixte 15 qui résulte de l'action du chlorocarbonate d'éthyle en présence de triéthylamine sur l'acide aminé, selon une méthode décrite en 1951 par R. A. BOISSONNAS (27), J. R. VAUGHAN (28) et T. WIELAND (29). L'action de l'ammoniac sur l'anhydride mixte qui n'est pas isolé, fournit l'amide 12 avec un rendement de 40 %.

Une tentative de préparation de l'amide par l'intermédiaire de l'ester éthylique n'a pas abouti. Si l'estérification par l'alcool absolu en présence d'acide chlorhydrique est possible après 6 heures de reflux, son rendement n'est que de 15 %, et l'ammoniac ne réagit pas avec l'ester obtenu. Dans des conditions identiques, la tertioleucine conduit à l'ester méthylique avec un rendement quantitatif,

mais cet ester ne réagit pas non plus avec l'ammoniac (30). Il faut donc admettre que pour la N-diméthyl-isoleucine, la présence des deux $CH_3$ sur l'azote, ajoutée peut-être à la disubstitution en β du carboxyle, est à l'origine d'un encombrement stérique marqué.

Cet encombrement intervient, sans doute, également dans l'attaque de l'anhydride mixte par l'ammoniac. Le rendement obtenu est inférieur à celui qu'on pourrait attendre d'une telle méthode (28, 29) et le mélange réactionnel contient à côté de l'amide une certaine quantité d'uréthane

$$NH_2COOC_2H_5$$

qui gène l'isolement de l'amide et doit être détruit par contact avec une solution de soude normale (31).

L'amide brut de synthèse conduit par cristallisation dans l'acétone à un produit identique à celui obtenu à partir de la pandamine. La méthode utilisée pour la préparation de l'amide à partir de la N-diméthyl-isoleucine ne touche pas les carbones asymétriques de la molécule. L'isomère pur ainsi préparé est donc, soit le N-diméthyl-L-isoleucinamide soit le N-diméthyl-D-alloisoleucinamide et le produit d'hydrolyse alcaline de la pandamine est un mélange de ces deux épimères. Il est démontré plus loin que l'isomère pur qui cristallise de ce mélange est le N-diméthyl-D-alloisoleucinamide.

Fraction 2 : produits acides

La solution aqueuse alcaline, après extraction du N-diméthyl-isoleucinamide, est acidifiée par l'acide chlorhydrique. Les acides qui précipitent partiellement sont extraits à l'éther. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters obtenus après action du diazométhane montre qu'il s'agit d'un mélange complexe qui n'a pas été étudié plus avant.

Fraction 3 : produits amphotères

La solution aqueuse, après élimination des produits alcalins et acides, contient une grande quantité de chlorure de sodium. Celui-ci peut être éliminé en majeure partie par reprise du résidu d'évaporation par de l'alcool absolu.

On obtient, à partir de la solution alcoolique, un mélange de chlorhydrates contenant encore une certaine quantité de chlorure de sodium et dont l'analyse peut-être effectuée par chromatographie sur couche mince de silice.

Fig.6

N-diméthyl-D-alloisoleucinamide

(Nujol)

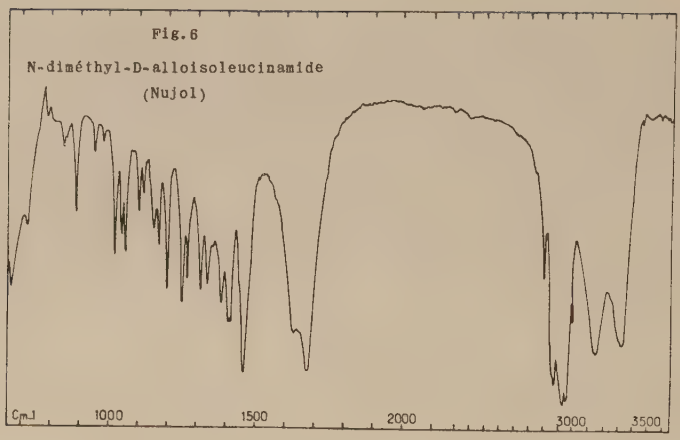



Fig.7

N-diméthyl-D-alloisoleucinamide

($CCl_4$)

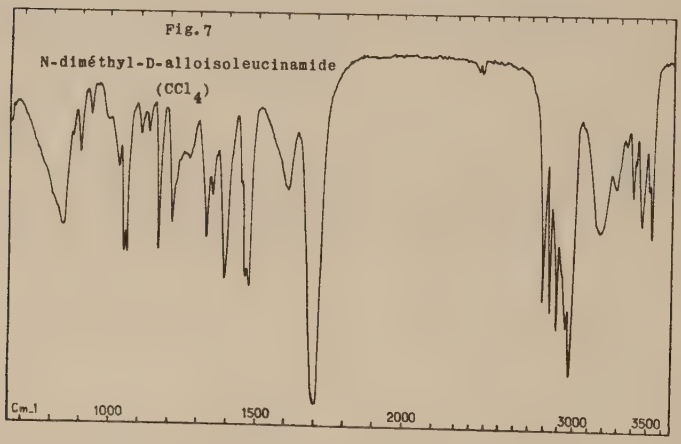
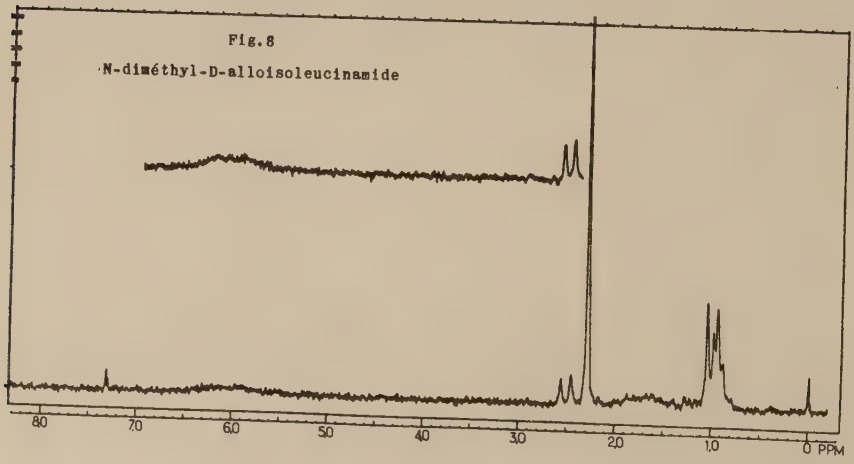



Fig.8

N-diméthyl-D-alloisoleucinamide

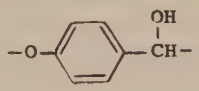


Le chromatogramme, développé par un mélange de chlorure de méthylène, d'alcool absolu et d'ammoniaque et révélé par une solution de ninhydrine, est caractérisé par l'apparition de quatre taches nettes colorées en violet. La comparaison de leur $R_f$ à celui d'acides aminés témoins a permis d'identifier, par ordre de polarité décroissante

- la leucine ou l'isoleucine
- la phénylanine, la tache donnée par ce produit étant nettement plus intense que celle donnée par le produit précédent.

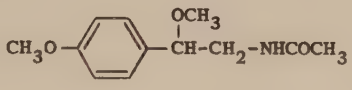
Les deux autres taches d'intensité inégale possèdent un $R_f$ supérieur à ceux des acides aminés classiques.

Ces taches pouvaient correspondre à des acides aminés de structure particulière, mais plutôt à des aminophénols qui auraient trouvé leur origine dans l'enchaînement



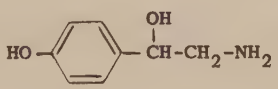
soupçonné lors de l'analyse fonctionnelle et la fusion alcaline.

Un premier essai de fractionnement par cristallisation effectué sur le mélange de chlorhydrates a permis d'isoler un composé correspondant à la tache de $R_f$ le plus élevé, qui, après acétylation et action du diazométhane, a conduit au p-méthoxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylacétamide 16,



16

identifié par une étude de structure et comparé au produit de synthèse décrit plus loin. Ce résultat confirmait la présence d'aminophénols ; on pouvait de plus supposer que le composé correspondant à la deuxième tache non identifiée, de $R_f$ légèrement supérieur à celui de la phénylalanine était l'alcool 17,



17

et que la fonction méthoxy du produit isolé résultait d'une réaction secondaire au cours de l'hydrolyse alcaline dans le méthanol.

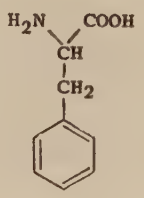
— La séparation systématique des quatre composés amphotères, révélés par la chromatographie sur plaque, a alors été entreprise.

On sait que les acides α-aminés, peu basiques, retenus sur une résine très acide telle qu'une résine sulfonique, ne sont pas fixés sur une résine carboxylique de type Amberlite IRC 50. Les aminophénols, dont la fonction OH est beaucoup moins acide que le carboxyle d'un amino-acide, doivent, au contraire, être retenus sur de telles résines.

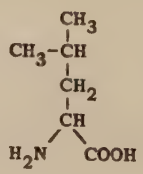
Dans une première étape, après élimination partielle du chlorure de sodium par insolubilisation dans l'éthanol, les ions $Cl^-$ et $Na^+$ encore présents, ont été éliminés selon la méthode décrite pour l'isolement de la phénylalanine : fixation des produits amphotères sur une résine sulfonique et élution par l'ammoniaque. Les produits amphotères, exempts de chlorure de sodium, sont ensuite passés sur la résine carboxylique qui retient sélectivement les aminophénols. Les acides aminés sont donc recueillis tout d'abord et les aminophénols sont élués par une solution ammoniacale.

a) Isolement des acides aminés

Les premières analyses par chromatographie sur plaque ayant établi la présence probable de phénylalanine et de leucine ou d'isoleucine, ces amino-acides ont été identifiés selon une méthode de chromatographie sur papier décrite par S. LISSITZKY et G. LAURENT (32), qui permet de différencier en une seule dimension la leucine, l'isoleucine et la phénylalanine. Cette méthode a confirmé la présence de phénylalanine et indiqué celle de leucine 18 à l'exclusion d'isoleucine.



4



18

La phénylalanine 4, possédant un noyau aromatique est, à l'inverse des acides aminés aliphatiques, fortement adsorbable sur charbon (33, 34). Le mélange des deux acides aminés, dissous dans une solution aqueuse d'acide acétique à 5 % a été passé sur une colonne de charbon activé, lavé à l'acide nitrique et additionné de célite. La leucine n'est pas retenue et peut être recueillie, la phénylalanine étant ensuite éluée par une solution d'acide acétique à 25 %. Cependant, nous avons pu vérifier, sur un mélange de phényl-

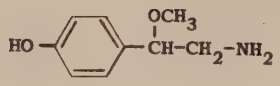
alanine et de leucine (90-10), que environ 10 % de la phénylalanine restaient fixés sur le charbon de façon irréversible.

Cette méthode a permis d'obtenir, dans une hydrolyse effectuée à partir de 3 g de pandamine, 90 mg de leucine et 580 mg de phénylalanine brutes, dont les spectres IR sont superposables à ceux d'échantillons racémiques de référence. Les deux produits sont recristallisés dans un mélange d'alcool et d'eau, puis sublimés. Ils ne présentent pas de pouvoir rotatoire.

b) Isolement et identification des aminophénols

Les deux aminophénols, sont séparés par chromatographie sur colonne de silice, chaque fraction étant analysée par chromatographie sur plaque.

1) p-hydroxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylamine 19 :




19

Ce produit, isolé en tête de la chromatographie sur silice, donne par chromatographie en couche mince, une seule tache correspondant à la tache de $R_f$ le plus élevé du mélange de produits amphotères initial. Après cristallisation dans l'alcool absolu, il fond à 145° et ne présente pas de pouvoir rotatoire. Son analyse élémentaire correspond à la formule brute $C_9H_{13}O_2N$.

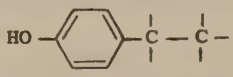
Il fournit un monochlorhydrate, F = 186°, de formule brute $C_9H_{13}O_2N$, HCl.

Il donne avec le chlorure ferrique une coloration violette. Son spectre UV, dans l'éthanol, présente en milieu neutre deux maximums à 226 et 277 mμ et en milieu alcalin deux maximums à 248 et 277 mμ ; ce déplacement est caractéristique d'un phénol.

L'ensemble des autres données spectrales permet de déterminer sa structure.

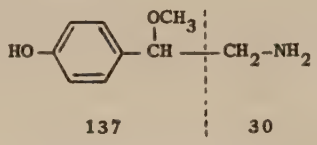
L'étude des spectres IR et RMN établit la présence d'un noyau aromatique paradisubstitué : bandes à 1600, 1510 et 835 $cm^{-1}$ dans le spectre IR ; signaux d'un système $A_2B_2$ entre 6,8 et 7,4 ppm correspondant aux hydrogènes 2, 3, 5 et 6 dans le spectre de RMN du chlorhydrate (fig. 10).

Les deux carbones aliphatiques restant et la fonction phénol forment donc l'enchaînement :



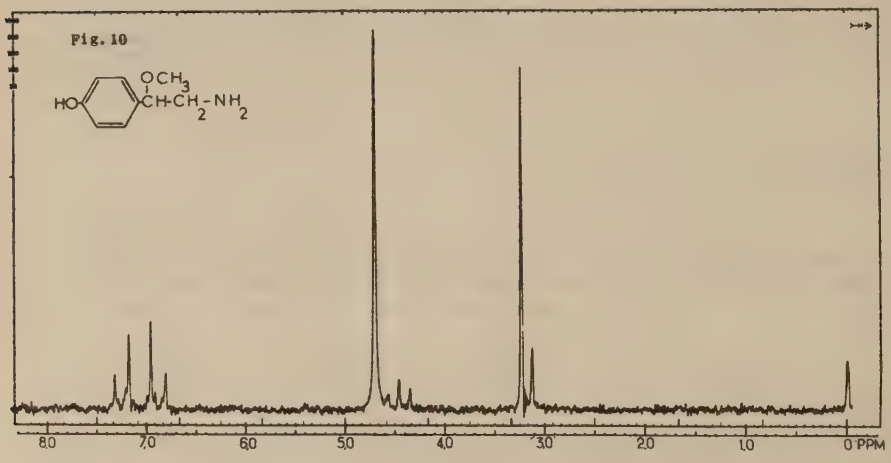
Le spectre de RMN, avec un singulet à 3,22 ppm, établit la présence d'un groupe $OCH_3$ ou $N\text{-}CH_3$.

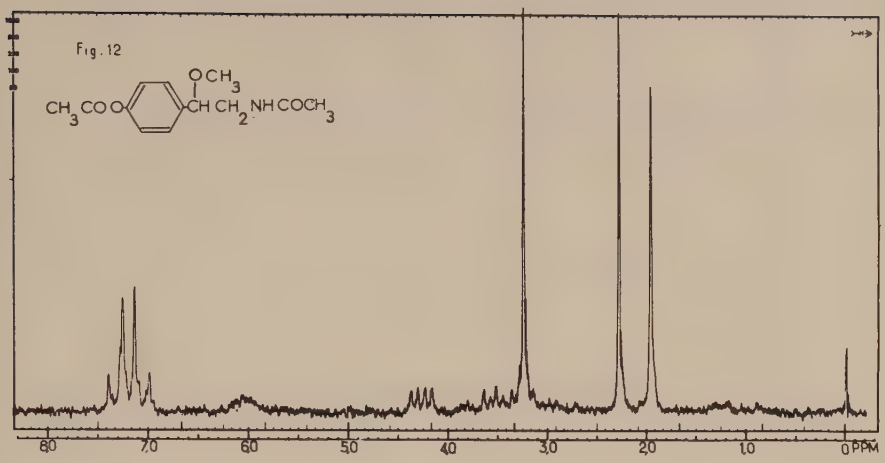
Le spectre de masse (fig. 11) permet de préciser qu'il s'agit bien d'un groupe $OCH_3$ et que celui-ci est fixé sur le carbone en $\alpha$ du noyau aromatique. On trouve, en effet, en plus du pic moléculaire $M^+ = 167$, les deux pics m/e = 137 et m/e = 30, correspondant à la coupure classique suivante :



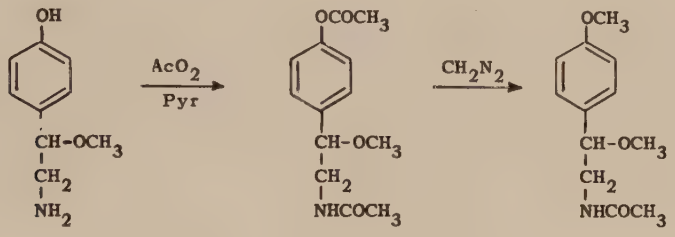

Ces deux pics sont incompatibles avec la présence d'un méthoxy en $\beta$ ou la présence d'un groupe $N\text{-}CH_3$.

La formule 19 permet d'interpréter également sur le spectre de RMN, le triplet à 4,45 ppm correspondant à l'hydrogène benzylique et un doublet à 3,18 ppm (en partie caché par le pic $OCH_3$), dû au $CH_2$ en $\alpha$ de l'azote, l'ensemble formant un système $A_2X$.






- Ces résultats ont été confirmés, d'une part par l'étude de deux dérivés de l'aminophénol 19, le p-acétoxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylacétamide 20 et le p-méthoxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylacétamide 16, obtenus par action successive de l'anhydride acétique et du diazométhane, d'autre part par la synthèse du composé 16.




19 20 16

Le dérivé acétylé 20, F = 72°, répond à la formule brute $C_{13}H_{17}O_4N$.

Son spectre IR, dans le Nujol, présente les bandes caractéristiques de la fonction amide à 3200, 1650 et 1550 $cm^{-1}$ et de la fonction ester à 1760 $cm^{-1}$ et 1210 $cm^{-1}$.

Son spectre de RMN (fig. 12) montre les trois singulets caractéristiques des méthyles N-CO-$CH_3$, O-CO-$CH_3$ et $OCH_3$ respectivement à 1,95, 2,25 et 3,25 ppm. Les signaux correspondant au groupement -CH-$CH_2$- forment un ensemble plus complexe que celui observé pour l'aminophénol 19. Le CH apparaît sous forme d'un quadruplet centré à 4,30 ppm et le $CH_2$ sous forme d'un multiplet entre

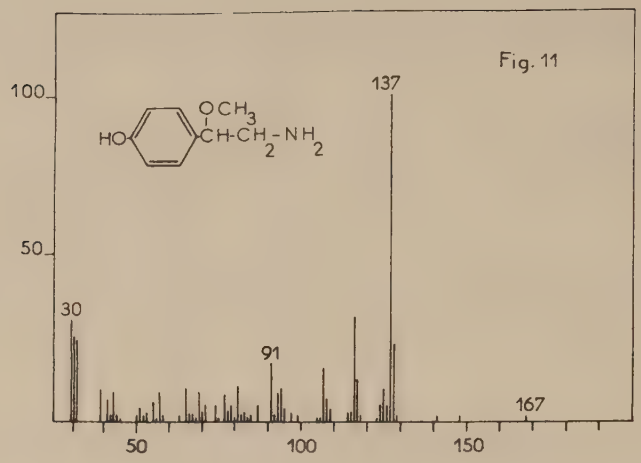


Fig. 11
100
50
137
30
91
167
HO
OCH3
CH-CH2-NH2
50
100
150

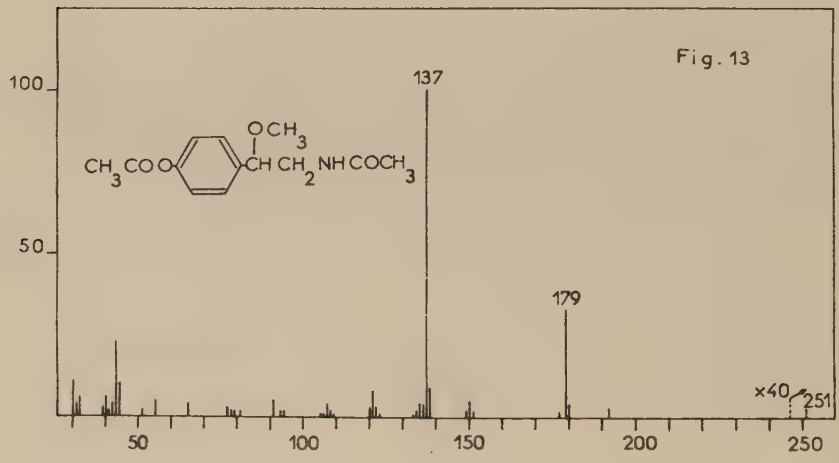


Fig. 13
100
50
137
179
×40
251
CH3CO O
OCH3
CH CH2 NH COCH3
50
100
150
200
250

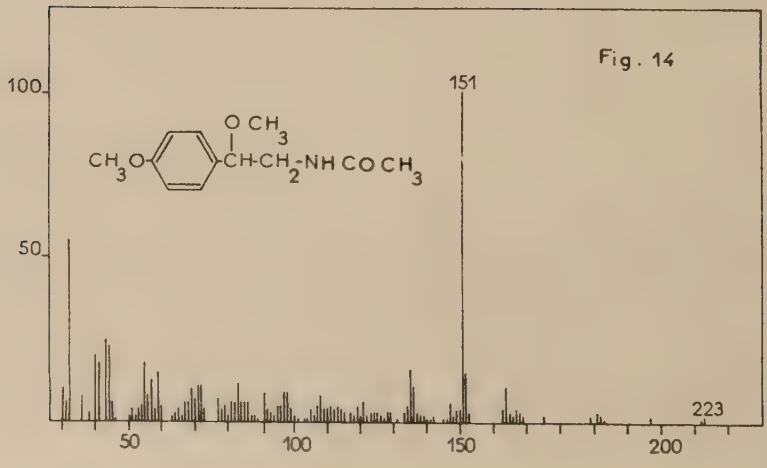
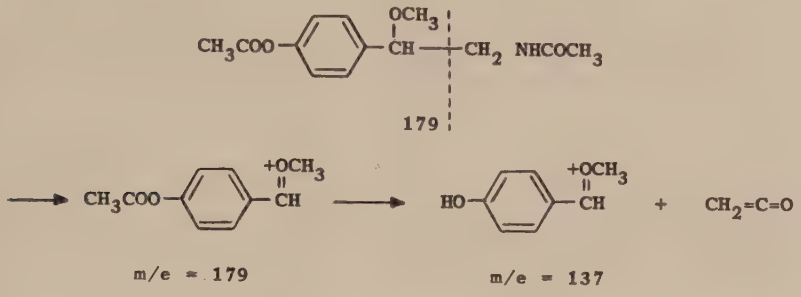


Fig. 14
100
50
151
223
CH3O
OCH3
CH-CH2-NH CO CH3
50
100
150
200

3,0 et 3,9 ppm. Ce résultat peut s'expliquer par un système AB-X dû vraisemblablement à un encombrement plus important du groupe acétamido qui perturbe l'équilibre conformationnel.

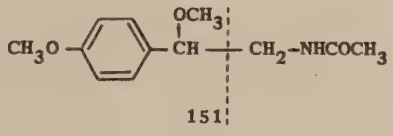
Le spectre de masse (Fig. 13) présente le pic moléculaire $M^+$=251 et deux pics principaux m/e = 179 et m/e = 137 correspondant à la coupure suivie d'élimination de cétène, selon le schéma :




La présence d'un pic métastable m = 105 (calculé m = 104,8) établit bien la filiation de l'ion m/e = 137, dérivant de l'ion m/e = 179 par perte de cétène, classique pour les esters phényliques (24b).

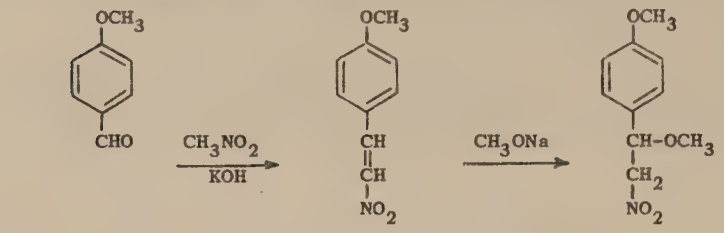
Le dérivé méthoxylé 16 a été obtenu par action du diazométhane sur le dérivé 20. Le remplacement d'un acétyle par un méthoxy a déjà été signalé au cours d'une étude sur la Nor-adrénaline (35). Les auteurs précisent qu'il faut utiliser un diazométhane humide sans plus de détails. Nous avons, pour notre part, effectué cette réaction avec un diazométhane en solution éthérée, simplement désséché sur potasse et non distillé.

Le produit obtenu, F = 70°, possède la formule brute suivante : $C_{12}H_{17}O_3N$. Son spectre IR ne présente plus la bande carbonyle caractéristique de la fonction ester. Sur le spectre de RMN, le pic à 2,25 ppm ($O-CO-CH_3$) est remplacé par un singulet à 3,80 ppm correspondant au groupe $OCH_3$ aromatique. Le spectre de masse (fig. 14) présente un pic principal m/e = 151 qui s'interprète par la coupure :

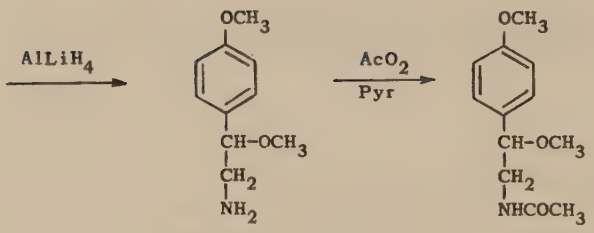



Synthèse de p-méthoxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylacétamide 16 : le chlorhydrate de l'amine correspondante 24 est préparé selon le procédé décrit par K. W. ROSENMUND (36) et conduit par acétylation à un produit identique à celui obtenu à partir de la pandamine (fusion, IR NMR).

La synthèse a été réalisée selon le schéma :



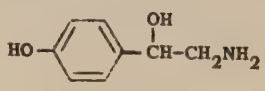

21 22 23




24 16

L'aldéhyde anisique 21 est condensé avec le nitrométhane en milieu alcalin et conduit au nitrostyrène 22. L'attaque de la double liaison activée par le méthanolate de sodium aboutit à l'éther méthylique 23. ROSENMUND réduisait la fonction nitro par l'amalgame de sodium en milieu chlorhydrique. Nous avons effectué cette réduction par action de $AlLiH_4$ dans l'éther à reflux (37) et cristallisé l'amine sous forme de chlorhydrate.

2) p-hydroxy-phényl-2 hydroxy-2 éthylamine ou octopamine 17 :




17

Ce composé, plus polaire que le précédent, est isolé, en quantité nettement plus faible, dans les dernières fractions de la chromatographie sur silice. Sa structure a été établie par voie synthétique.

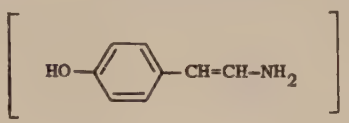
Plusieurs synthèses du dérivé racémique ont été décrites (38, 39, 40). Cet aminophénol a été identifié également dans les substances naturelles, urine animale (41), venin des glandes salivaires de l'octopus vulgaris (42), d'où le nom d'octopamine qui lui

est souvent donné. La forme active, lévogyre, F = 167° (déc.), $[\alpha]_D$ = -41°, a été récemment isolée d'une variété de Citrus cultivé (43).

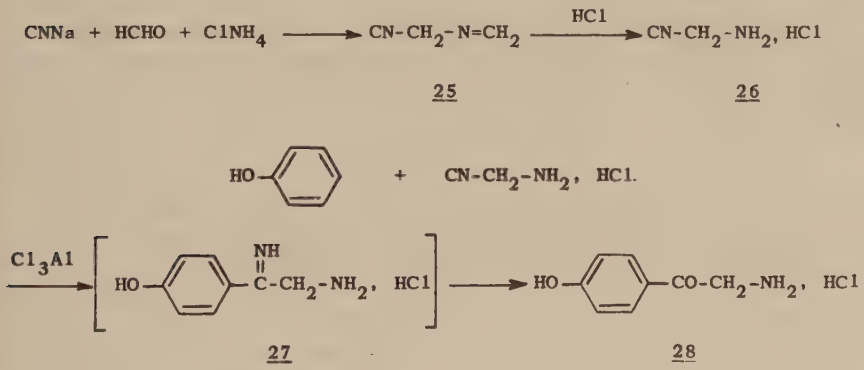
Le produit obtenu à partir de la pandamine fond à 161° (déc.) et ne présente pas de pouvoir rotatoire. Le point de fusion du produit racémique décrit par C. MANNICH est de 158° (40).

Le spectre IR est identique au spectre publié pour l'octopamine racémique (43). Le spectre UV, dans l'acide chlorhydrique 0,1 n, présente deux maximums à 222 et à 273 mμ, identiques à ceux décrits (43).

Le spectre de masse ne présente pas de pic moléculaire. Le pic principal m/e = 135 ne correspond pas à la coupure observée pour les dérivés méthoxylés, mais à la perte d'une molécule d'eau, avec formation de l'ion suivant fortement stabilisé par résonance :



Synthèse : le chlorhydrate de la cétone correspondant à l'octopamine a d'abord été obtenu, selon la méthode décrite par M. ASSCHER (38), résumée dans le schéma suivant :



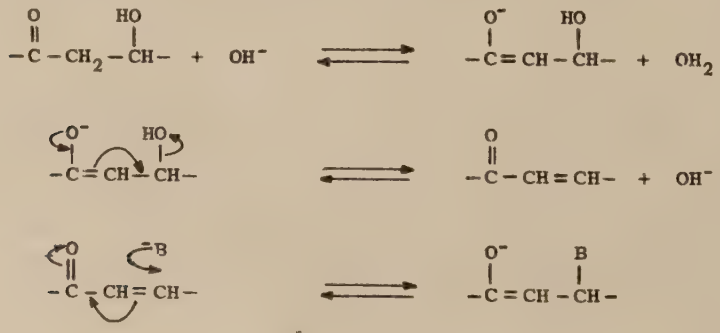
Le méthylène-acétonitrile 25 est préparé par une réaction du type Mannich entre le cyanure de sodium, le formol et le chlorure d'ammonium, suivie de la formation d'une base de Schiff avec le formol. L'amino-acétonitrile 26, libéré en milieu acide, réagit en para avec le phénol, en présence de chlorure d'aluminium, selon une réaction de type Friedel et Craft, conduisant à une imine 27 hydrolysée dans le milieu acide en cétone 28.

La réduction du chlorhydrate de la cétone, en solution dans un mélange alcool-eau, par l'hydrogène en présence de charbon palladié (40) conduit au chlorhydrate de l'octopamine racémique F = 175° (déc.). Par passage sur une résine sulfonique et élution par l'ammoniaque, on obtient la base qui est identique à celle isolée à partir de la pandamine (Fusion, IR, RMN, chromatographie sur plaque).

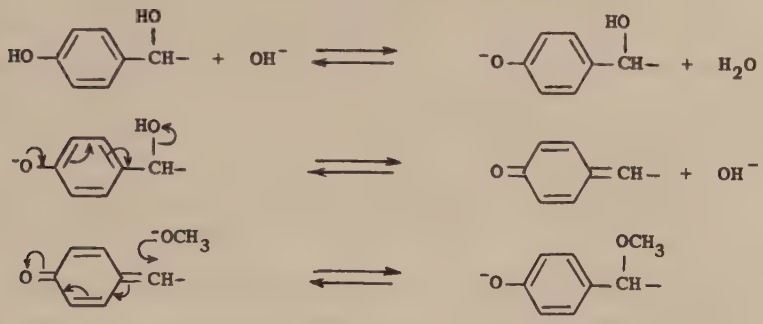
Selon toute vraisemblance, les deux aminophénols isolés au cours de l'hydrolyse alcaline proviennent du même fragment de la pandamine, le dérivé méthoxylé se formant à partir du dérivé hydroxylé par une réaction secondaire, intervenant au cours de l'hydrolyse alcaline effectuée en présence de méthanol. En effet, le groupement méthoxyle n'a pas été identifié dans la pandamine qui, par contre, présente bien les caractères d'un alcool secondaire. Si l'octopamine que nous avons préparée par synthèse est soumise aux conditions de l'hydrolyse alcaline de la pandamine, il se forme une certaine quantité de dérivé méthoxylé qui peut être isolée après neutralisation sur colonne de résine sulfonique et chromatographie sur silice. Bien que le rendement en ce produit soit nettement inférieur à celui de l'hydrolyse alcaline de la pandamine, ce résultat, joint aux remarques précédentes, établit la filiation entre le dérivé hydroxylé et le dérivé méthoxylé.

On sait que les substitutions nucléophiles directes de la fonction hydroxyle en milieu alcalin n'ont pas lieu. On ne peut donc interpréter simplement la formation du dérivé méthoxylé par substitution de l'OH par les ions $CH_3O^-$ présents dans le milieu. La réactivité de l'octopamine doit être recherchée dans sa structure d'alcool benzylique para-hydroxylé, qui en fait un vinylogue d'aldol sous sa forme énolique.

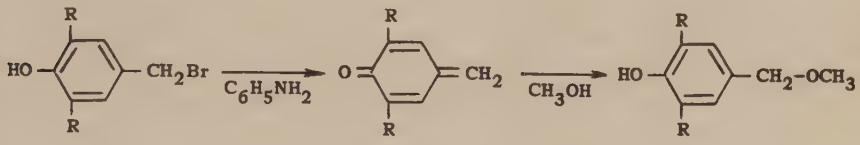
Un aldol peut conduire en milieu alcalin à une cétone conjuguée dont la double liaison activée est susceptible de subir une attaque par un anion $B^-$. L'addition en particulier de méthanol en milieu alcalin sur les cétones conjuguées est connu (44).



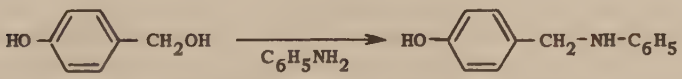
On peut interpréter de façon analogue le remplacement de OH par $OCH_3^-$ dans un alcool benzylique para-hydroxylé.



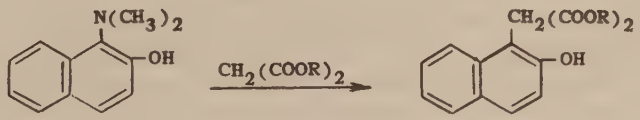
Cet alcool benzylique passe par un intermédiaire de forme quinonique qui est ensuite attaqué par $OCH_3^-$. Dans certaines conditions de substitution du noyau benzénique, un dérivé quinonique stable a été décrit, qui réagit effectivement avec le méthanol pour conduire à l'alcool benzylique méthoxylé (45).



Des réactions de même nature ont été également signalées pour le remplacement de OH benzyliques par des fonctions amines (46),



et pour le remplacement d'amines benzyliques par des carbanions (47).



## PREMIERE HYPOTHESE SUR LA STRUCTURE DE LA PANDAMINE

Les résultats de l'hydrolyse alcaline, joints à ceux de l'hydrolyse acide, de la fusion alcaline et de l'analyse fonctionnelle, ont permis de formuler une première hypothèse sur la structure possible de la pandamine.

L'hydrolyse alcaline aboutit, en effet, à l'isolement de quatre composés :

le N-diméthyl-isoleucinamide, la phénylalanine, la leucine et l'octopamine.

On retrouve dans ces quatre composés les 31 atomes de carbone de la pandamine. Il suffirait donc d'établir les modes de liaison entre ces différents fragments pour élucider le problème de la structure de la molécule.

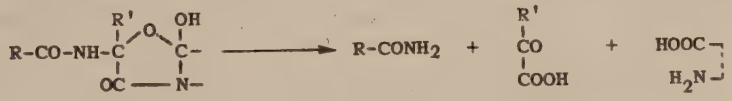
Cependant, le bilan de l'hydrolyse laisse apparaître quelques difficultés. La somme des quatre composés donne un total de $C_{31}H_{53}O_7N_5$ alors que la formule brute de la pandamine est $C_{31}H_{44}O_5N_4$. L'hydrolyse fait donc apparaître un excédent de 2 atomes d'oxygène, 9 atomes d'hydrogène et 1 atome d'azote. Si l'on considère que la fixation de 2 O s'accompagne de celle de 4 H, on constate l'addition supplémentaire de 5 atomes d'hydrogènes et de 1 atome d'azote. On ne peut donc considérer que l'hydrolyse alcaline conduit à de simples ruptures de liaisons peptidiques ; elle s'accompagne nécessairement de réactions plus complexes.

L'examen de la nature des composés obtenus amène à une conclusion analogue quant à la complexicité de la dégradation alcaline de la pandamine. La fonction amine tertiaire et la fonction alcool secondaire, mises en évidence par l'analyse fonctionnelle, sont retrouvées dans le groupement diméthylamino du N-diméthyl-isoleucinamide et dans la fonction alcool de l'octopamine. Toutes les autres fonctions ne préexistent pas à l'état libre dans la pandamine et sont donc engagées dans des liaisons qui sont rompues au cours de la dégradation alcaline. L'hydrolyse de liaisons amides ne peut rendre compte que d'une partie de cette dégradation, c'est-à-dire de la libération des fonctions amines et des fonctions caboxyles ; encore peut-on observer que deux fonctions carboxyles apparaissent pour trois fonctions amines. Une simple hydrolyse alcaline ne peut interpréter ni la libération de la fonction amide du N-diméthyl-isoleucinamide, ni celle de la fonction phénol de l'octopamine. Enfin, il était à remarquer que, si la phénylalanine est isolée aussi bien après hydrolyse acide qu'après hydrolyse alcaline, la

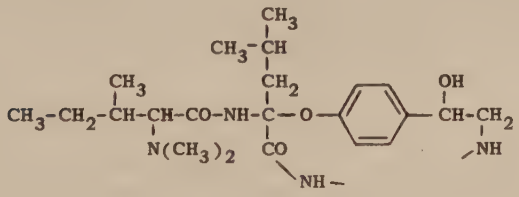
leucine n'apparaît qu'après hydrolyse alcaline et avec un rendement nettement inférieur à celui de la phénylalanine. Une leucine, engagée dans des liaisons peptidiques normales, aurait dû être libérée dans les conditions d'hydrolyse acide utilisées et, expérimentalement, il a été vérifié que la leucine ajoutée au milieu réactionnel acide n'était pas détruite.

Une première hypothèse pouvait cependant être suggérée par une analogie avec les alcaloïdes de l'Ergot de Seigle. L'hydrolyse de ceux-ci dans certaines conditions permet d'isoler, nous l'avons vu, l'amide de l'acide lysergique.

La formation de cet amide doit s'interpréter par une hydrolyse au niveau de la fonction orthoacide qui libère un $\alpha$-amido-carbinol. Ce dernier, instable en milieu alcalin (48), se décompose en amide et en acide $\alpha$-cétonique (cet acide cétonique reste fixé par une fonction amide au reste de la molécule, mais peut être libéré par une hydrolyse plus poussée) :



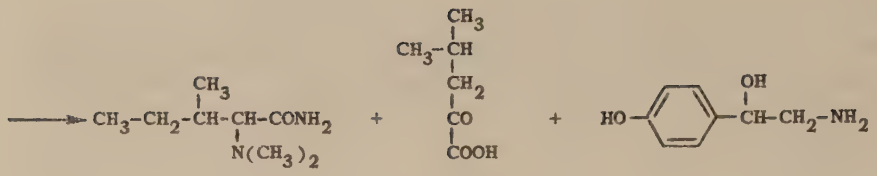
Pour la pandamine, un enchaînement du type



comportant, non pas une fonction ester d'amido-carbinol, mais une fonction éther, pouvait permettre tout d'abord d'expliquer la libération simultanée de la fonction amide et de la fonction phénol. Cette hypothèse ne se révélait cependant pas très satisfaisante, la rupture alcaline d'une fonction éther de phénol, nécessaire pour libérer l'amido-carbinol n'étant pas évidente.

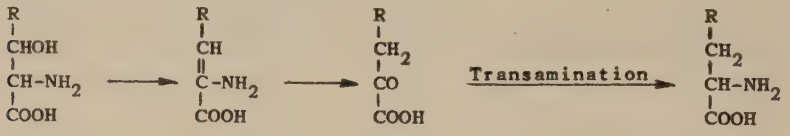
Mais cette hypothèse permettait :

1 - d'interpréter l'isolement de la leucine uniquement formée au cours de l'hydrolyse alcaline. En effet, à partir d'un tel enchaînement, cette hydrolyse doit conduire à l'acide cétonique 29 de même squelette carboné que la leucine.



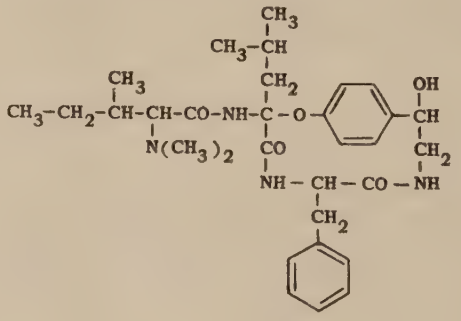
12 29 17

Or, la formation d'un acide $\alpha$-aminé en milieu alcalin concentré à partir de l'acide $\alpha$-cétonique correspondant est possible par transamination avec un autre acide aminé. C'est ce qui est mis en évidence par T. WIELAND (49), qui établit que cette réaction peut s'effectuer à partir d'acides aminés $\beta$-hydroxylés. Ceux-ci subissent une déshydratation suivie d'hydrolyse, conduisant à un acide cétonique qui se transamine avec l'acide aminé de départ.




L'acide aminé nécessaire à la transamination de l'acide isopropyl-pyruvique serait ici la phénylalanine.

2 - d'aboutir, si les éléments de la phénylalanine viennent compléter l'enchaînement considéré, à une formule de la pandamine 30 en accord avec l'analyse élémentaire.



30

Cette première hypothèse demandait évidemment à être vérifiée par l'isolement dans des conditions plus douces d'un fragment ayant conservé une partie de l'enchaînement particulier de la pandamine.

## III - ETABLISSEMENT DE LA STRUCTURE REELLE

### A - HYDROLYSE ACIDE PARTIELLE DE LA PANDAMINE

L'hydrolyse acide partielle des peptides cycliques est généralement réalisée à 37° dans mélange d'acide acétique et d'acide chlorhydrique (14, 15, 17, 34, 50). Il était logique de penser que cette technique, appliquée à la pandamine, conduirait à une coupure préférentielle au niveau des fonctions amides reliant la phénylalanine au reste de la molécule, puisqu'il a été montré qu'un encombrement stérique important est apporté par le groupe $N(CH_3)_2$ de l'élément isoleucine ; mais même après un contact prolongé, aucune trace de phénylalanine n'a pu être mise en évidence dans le mélange réactionnel.

Cette hydrolyse a été reprise dans des conditions différentes : ébullition à reflux pendant 16 heures dans un mélange d'acide chlorhydrique, d'acide acétique et d'eau (HCl, 10, AcOH, 5, $H_2O$, 5).

L'hydrolyse est partielle ; après évaporation à sec et reprise du résidu par l'eau ammoniacale, on extrait, au chlorure de méthylène, des produits basiques à partir desquels on peut séparer, par chromatographie sur silice, un mélange de pandamine de départ et d'un deuxième produit légèrement moins polaire formé par épimérisation de la fonction alcool. En effet, un mélange identique (chromatographie sur plaque, spectre IR) a pu être obtenu par réduction de la pandaminone au moyen du borohydrure de sodium.

Les produits amphotères sont neutralisés sur colonne de résine sulfonique, selon la méthode habituelle. Leur étude par chromatographie sur couche mince met en évidence deux produits :

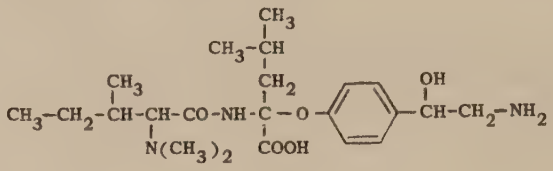
- la phénylalanine
- et un produit moins polaire, caractérisé par une réaction négative avec la ninhydrine et positive avec le réactif de Dragendorff.

La reprise du mélange par de l'alcool absolu laisse un résidu constitué par la majeure partie de la phénylalanine. Le composé moins polaire 31 est isolé par chromatographie de la solution alcoolique précédente sur acide silicique. Il cristallise dans le méthanol, F = 217°, $[\alpha]_D$ = +19° ($CH_2Cl_2$ - $CH_3OH$ 50-50, c = 1), et répond à la formule brute $C_{20}H_{32}O_4N_2$.

Par action du diazométhane, ce produit conduit à un ester méthylique F = 80°, $[\alpha]_D$ = +9° ($CHCl_3$, c = 1), de formule brute

$C_{21}H_{34}O_4N_2$. Ce résultat, rapproché de ses propriétés amphotères permet d'attribuer à cette molécule la structure d'un amino-acide.

Cet amino-acide peut avoir la structure 31a, déduite de celle qui a été proposée précédemment pour la pandamine, si l'hypothèse d'une hydrolyse préférentielle des liaisons CO-NH fixant la phénylalanine au reste de la molécule est exacte.



31a

Le spectre IR (Nujol) présente effectivement des bandes à 3200 et 1670 $cm^{-1}$ attribuables à une fonction amide -CO-NH- et une bande éther aromatique à 1245 $cm^{-1}$.

Par contre :

- la formule brute ainsi calculée est $C_{22}H_{39}O_5N_3$, alors que les résultats de l'analyse élémentaire sont en accord avec la formule $C_{20}H_{32}O_4N_2$.
- la réaction à la ninhydrine est négative : la molécule ne possède donc pas de fonction $CH_2$-$NH_2$.

La structure définitive de cet amino-acide a été déduite de l'étude du spectre de RMN de son ester méthylique (le spectre de l'acide lui-même ne peut être réalisé que dans l'acide trifluoroacétique et ne montre pas de signaux nets).

ETUDE DU SPECTRE DE RMN DE L'ESTER METHYLIQUE DE L'ACIDE AMINE 31 (Fig. 15a).

Ce spectre montre :

- entre 0,6 et 1,2 ppm, 12 à 13 protons qui correspondent aux 4 $CH_3$ aliphatiques, soit

à 0,72 ppm, un doublet (J = 6,5 c/s), attribuable au méthyle de type $CH_3$-$CHR_2$ du groupe butyle secondaire de l'élément de N-diméthyl-isoleucine

à 1,08 ppm, un doublet (J = 6,5 c/s), de plus forte intensité, attribuable aux deux méthyles du groupe $(CH_3)_2$-CH-

- à 2,20 ppm, le singulet du groupe $N(CH_3)_2$, soit 6 protons

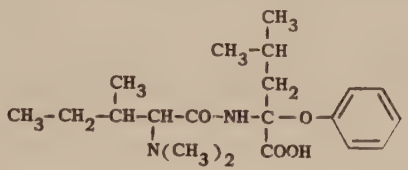
- à 2,53 ppm, le doublet du proton en $\alpha$ du groupe $N(CH_3)_2$, J = 5 c/s

- à 3,72 ppm, le singulet du groupe $COOCH_3$ (3 protons)

- entre 6,85 et 7,43 ppm, 6 protons.

Si la structure proposée pour l'amino-acide 31 était exacte, on devrait trouver dans cette région un système de signaux symétriques de type $A_2B_2$, caractéristique du noyau benzénique paradisubstitué.

Ce système est absent ; les signaux observés peuvent être attribués à un noyau benzénique monosubstitué par un hétéroatome. Ce fait, rapproché des résultats de l'analyse élémentaire et de l'absence de groupe $NH_2$ signalée précédemment, permet de donner à l'amino-acide 31, la nouvelle formule 31b.

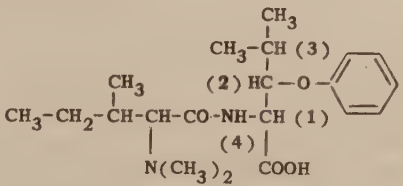


31b

Mais deux signaux demeurent encore ininterprétés. On note, en effet,

à 4,33 et 5,03 ppm, deux quadruplets, correspondant chacun à 1 proton. Les déplacement chimiques observés sont ceux d'hydrogènes portés par des carbones substitués par des hétéroatomes ; la formule 31b ne comporte aucun proton de ce type.

Cette difficulté est levée si on attribue à l'amino-acide 31 la formule 31c, dans laquelle l'$\alpha$-hydroxyleucine serait remplacée par une $\beta$-hydroxyleucine.



31c

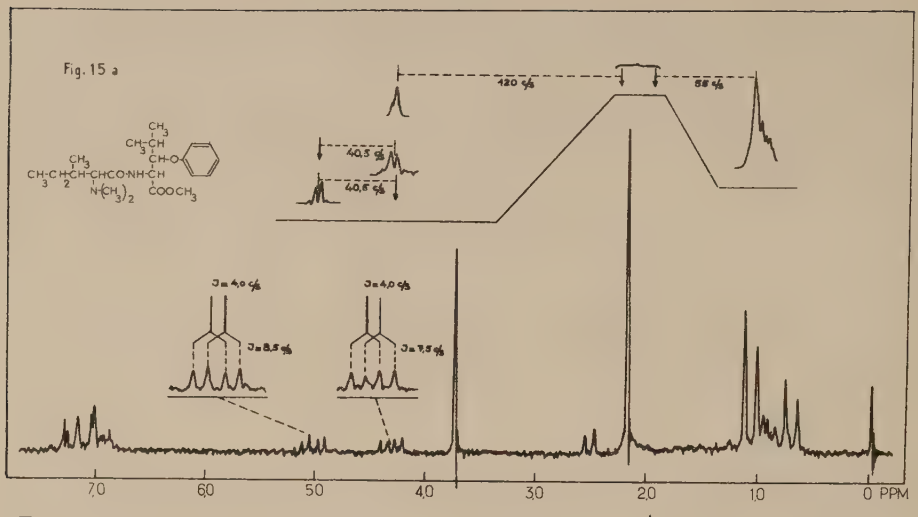


Fig. 15 a
120 c/s
88 c/s
40,5 c/s
40,6 c/s
J = 4,0 c/s
J = 8,5 c/s
J = 4,0 c/s
J = 7,5 c/s
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0 PPM

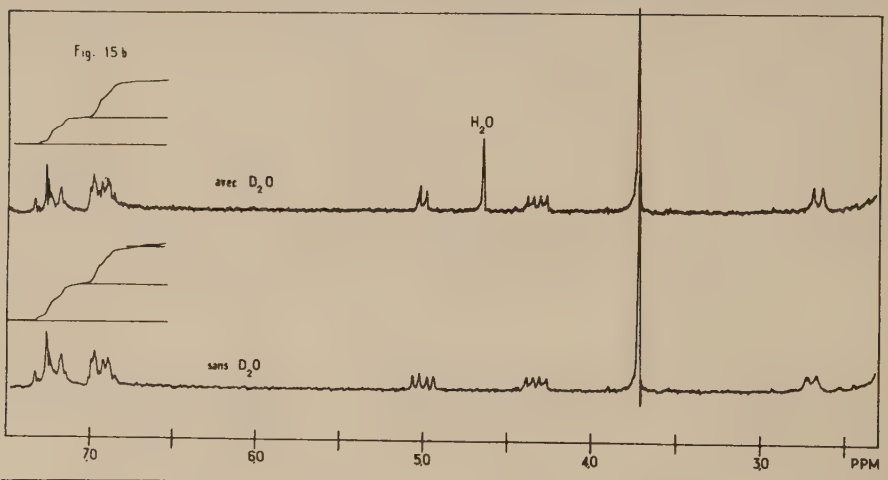


Fig. 15 b
H2O
avec D2O
sans D2O
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
PPM

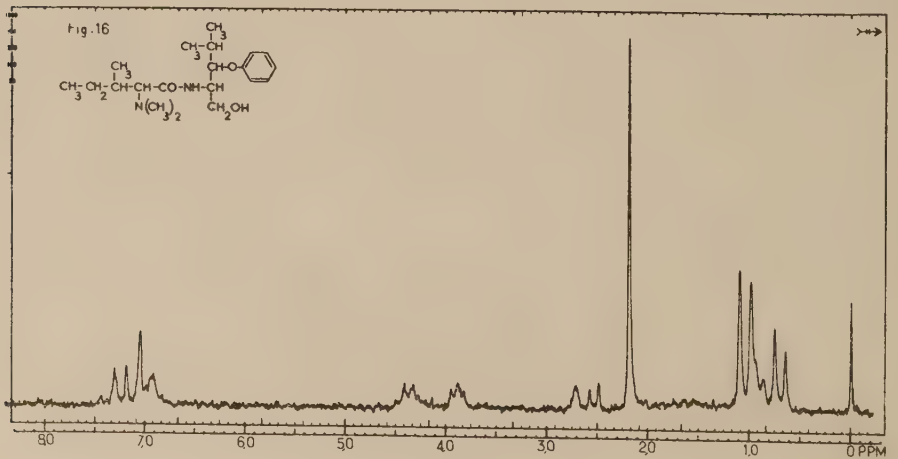


Fig. 16
9,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0 PPM

Les protons (1) et (2) sont alors portés par des carbones liés respectivement à un atome d'azote et à un atome d'oxygène, et la forme quadruplet des signaux peut s'expliquer par un double couplage :

un premier couplage des deux protons entre eux
un deuxième couplage de chacun d'eux avec un autre proton en $\alpha$ :

le proton (3) pour le proton (2)
le proton (4) du groupe NH pour le proton (1)

Cette hypothèse a été entièrement vérifiée, d'une part, par la méthode de double irradiation, d'autre part par deutération du proton du groupe NH.

Méthode de double irradiation :

Mise en évidence du couplage mutuel des deux protons à 4,33 ppm et à 5,03 ppm : ce couplage ($J = 4$ c/s) est démontré de la façon suivante : par irradiation du signal à 5,03 ppm avec $\Delta\nu = 40,5$ c/s, le signal à 4,33 ppm devient un doublet ; l'opération inverse donne au signal à 5,03 ppm l'allure d'un doublet.

Couplage du proton (2) avec le proton (3) : le couplage du proton à 4,33 ppm avec le proton (3) ($J = 7,5$ c/s) est mis en évidence par irradiation de la zone à $2,24 \pm 1$ ppm où doit être situé le proton (3) sous forme d'un signal très étalé : le signal à 4,33 ppm apparaît alors sous l'aspect d'un doublet peu résolu et le doublet des deux méthyles du groupe isopropyle est réduit à un singulet. Le signal à 4,33 ppm correspond donc au proton (2), placé en $\alpha$ du groupe isopropyle.

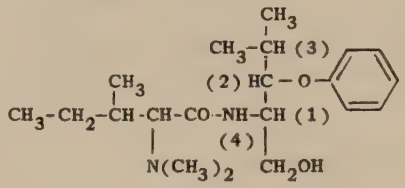
Couplage du proton (1) avec le proton (4) : la mise en évidence du couplage du proton (1) qui donne le signal à 5,03 ppm avec le proton (4) ($J = 8,7$ c/s) peut être effectuée par irradiation de la zone dans laquelle est situé le proton NH. Celui-ci se trouve superposé aux 5 protons aromatiques dans la région de 7,2 ppm ; l'intégration de cette zone correspond effectivement à 6 protons. L'irradiation à ce niveau n'a cependant pas permis de supprimer le couplage considéré, sans doute par suite du trop grand étalement du proton (4).

Méthode par deutération :

Elle permet de mettre en évidence ce dernier couplage. Après deutération, le spectre de l'ester présente à la place du quadruplet à 5,03 ppm un doublet ($J = 4$ c/s), tandis qu'une légère différence dans l'intégration de la zone des protons aromatiques (0,6 ppm)

rend compte de la disparition du signal du NH remplacé par ND (fig. 15 b). Des exemples de couplage avec un proton amidique ont déjà été signalés (51).

Le spectre de RMN de l'alcool 32 (fig. 16), F = 95°, $[\alpha]_D$ = +20° ($CHCl_3$, c = 1), de formule brute $C_{20}H_{34}O_3N_2$ obtenu par réduction de l'ester au moyen de l'hydrure d'aluminium-lithium, est également en accord avec ces résultats.



32

En effet, on observe sur ce spectre un multiplet de deux protons entre 4,1 et 4,53 ppm qui doit s'interpréter par la superposition du signal du proton (2) (à 4,33 ppm sur le spectre de l'ester) avec le signal du proton (1) (à 5,03 ppm sur le spectre de l'ester) qui s'est déplacé, ce proton ne se trouvant plus en $\alpha$ du même groupement. Le signal du groupe $CH_2$ de la fonction alcool primaire est à 3,87 ppm et le signal du groupe OH, qui disparaît par deutération, est à 2,71 ppm.

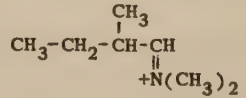
- La formule 31c de l'acide aminé isolé est encore confirmée :

1 - par la spectrographie de masse

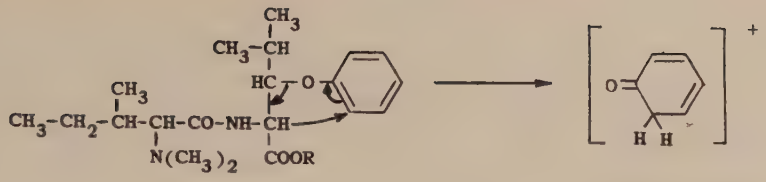
Spectres de l'acide aminé 31c et de son ester méthylique (fig. 17) :

On n'observe pas de pic moléculaire. Les deux ions principaux sont représentés par les pics m/e = 114 et m/e = 94.

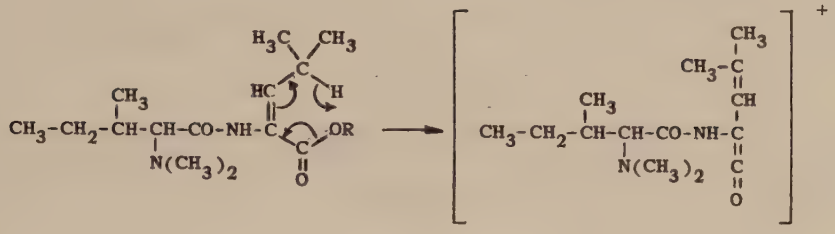
Le pic m/e = 114 est le même que celui décrit dans le spectre de masse du N-diméthyl-isoleucinamide et représente l'ion :



Le pic m/e = 94 correspond à l'ion 33, formé suivant le mécanisme indiqué (24c) :



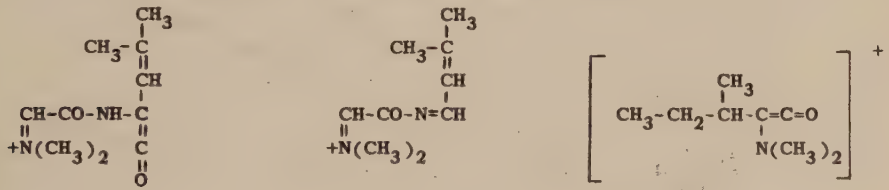
33 m/e = 94



34 35 m/e = 252

Si la charge est portée par le fragment basique de la molécule, il se forme, après départ du phénol, un ester ou un acide $\alpha\beta$-insaturé 34, conduisant par un mécanisme cyclique à un ion stable représenté par le cétène 35.

D'autres pics importants se situent à m/e = 195, m/e = 167 et m/e = 141 et peuvent être interprétés par les ions :



m/e = 195 m/e = 167 m/e = 141

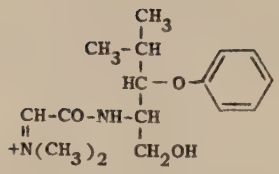
Des cétènes du type le l'ion m/e = 141 ont été déjà observés dans le spectre de masse de peptides (24d).

Il faut cependant signaler que l'intensité des pics obtenus varie nettement en fonction du temps ce qui est sans doute l'indice d'une décomposition thermique.

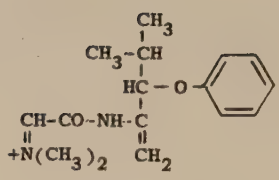
Spectre de masse de l'alcool 32 (fig. 18) :

Il ne présente pas de pic moléculaire. Les deux pics principaux sont également représentés par les pics m/e = 114 et m/e = 94, qui sont les mêmes que ceux de l'acide aminé 31c.

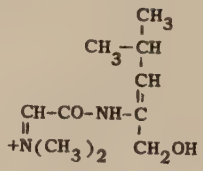
D'autres pics à m/e = 293, m/e = 275 et m/e = 199 peuvent s'interpréter par les ions :



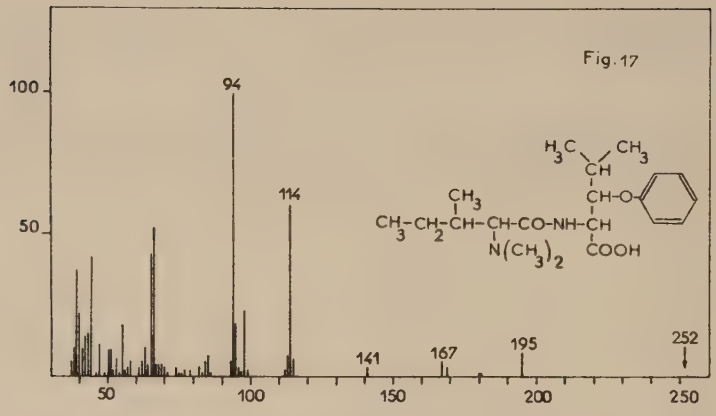
m/e = 293

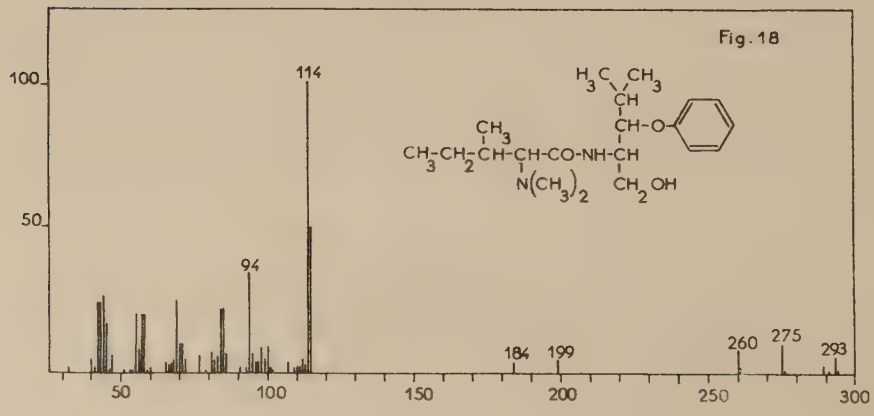


m/e = 275



m/e = 199



2 - par hydrolyse alcaline

La réaction est effectuée dans les mêmes conditions que l'hydrolyse alcaline de la pandamine.

La chromatographie sur plaque permet de mettre en évidence :

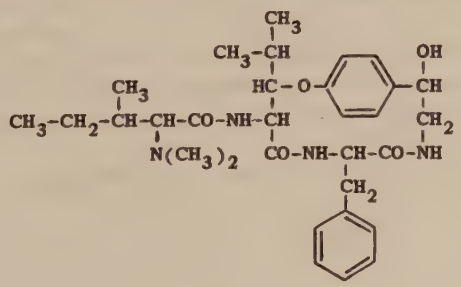
- le N-diméthyl-isoleucinamide, directement dans le mélange réactionnel.

- le phénol dans les produits extraits en milieu acide.

- l'absence de leucine : les produits restés en solution dans l'eau après extraction en milieu acide sont évaporés à sec. Le résidu est repris par l'alcool absolu et la solution obtenue est analysée. Aucune tache colorée par la ninhydrine n'est observée.

Si la même réaction est effectuée en présence de phénylalanine, on obtient par contre en chromatographie sur plaque, en opérant exactement dans les mêmes conditions, les taches de la phénylalanine et de la leucine. La leucine se forme donc bien en milieu alcalin à partir de l'enchaînement de β-hydroxyleucine que comporte l'amino-acide 31c à condition que la phénylalanine soit présente dans le milieu.

La démonstration définitive de la structure plane de l'amino-acide 31c conduit à attribuer à la pandamine la nouvelle formule 36. Il restait à montrer que celle-ci permet d'expliquer les résultats des hydrolyses alcaline et acide.

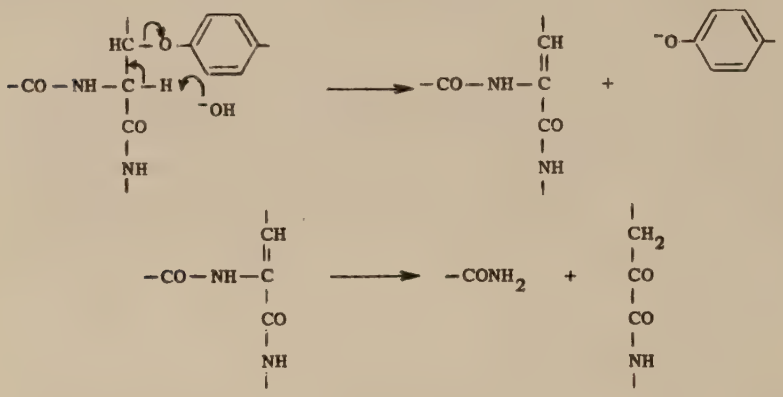


36

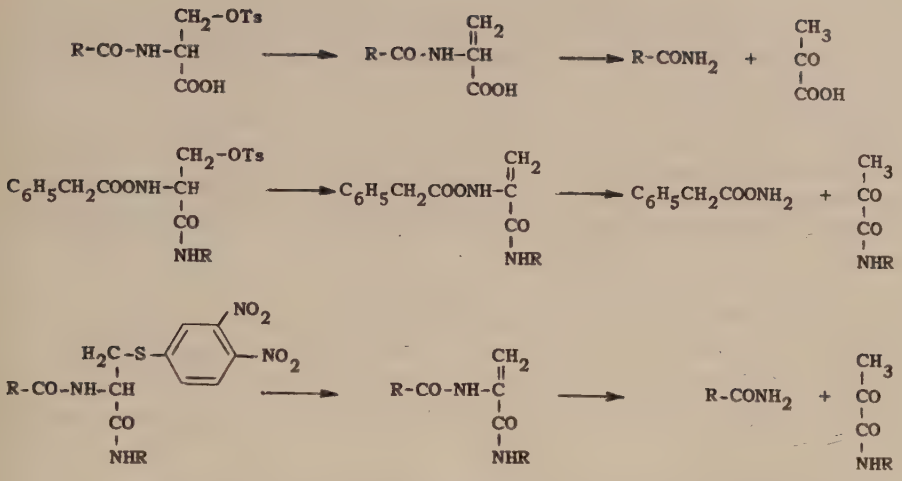
## INTERPRETATION DES RESULTATS DE L'HYDROLYSE ALCALINE

Les résultats de l'hydrolyse alcaline de la pandamine s'expliquent vraisemblablement de la façon suivante :

1°) la molécule subit une β élimination entre l'H mobile en α du groupe -CO-NH- qui unit l'élément de β-hydroxyleucine à la phénylalanine et l'éther de phénol, avec l'apparition d'un enchaînement ènamide hydrolysé à son tour avec libération de la fonction amide du N-diméthyl-isoleucinamide et du carbonyle d'un acide cétonique, l'acide isopropyl-pyruvique :



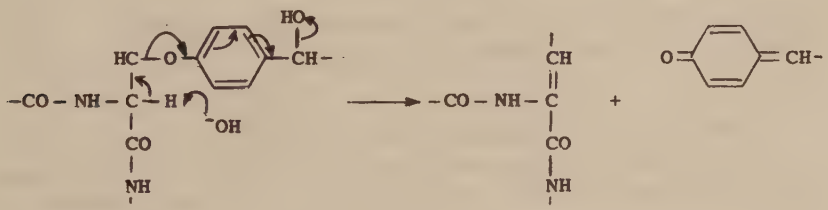
De telles éliminations, suivies de l'hydrolyse d'un ènamide, ont été décrites dans le cas d'acylamino-acides β-hydroxylés ou de N-carbobenzoxy-amides d'acides aminés β-hydroxylés, dont la fonction alcool est estérifiée par l'acide paratoluène sulfonique ou l'acide phosphorique (52, 53, 54), et également pour des peptides comportant un reste de cystéine activé sous forme de sulfonium ou sous forme de thioéther du dinitrothiophénol (55). La réaction d'élimination est possible dans ce cas en milieu alcalin très dilué et le déhydrodérivé peut être isolé, puis hydrolysé en milieu acide, neutre ou alcalin (52, 54, 55, 56).



L'élimination d'un ion phénate est évidemment moins facile que celle d'un paratoluène sulfonate, d'un phosphate, d'un sulfure ou d'un dinitrothiophénate, mais elle est cependant comparable à celle de la β-élimination d'un $OH^-$, élimination qui se produit par exemple au cours de la crotonisation des aldols en milieu alcalin.

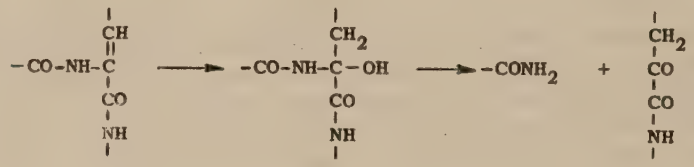
C'est d'ailleurs la β-élimination d'un $OH^-$ qui doit de même permettre d'expliquer la déshydratation d'un acide aminé β-hydroxylé en milieu alcalin concentré conduisant par l'intermédiaire d'un acide aminé αβ-éthylénique instable à un acide cétonique (18).

D'autre part, il est probable que la fonction alcool benzylique joue un rôle particulier dans le cas de la pandamine. On aurait une élimination du type



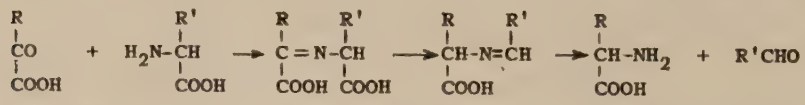
Une telle réaction aboutirait à la formation directe de la forme quinonique, qui réagirait ensuite facilement sur le milieu, préférentiellement avec le méthanol pour donner le dérivé méthoxylé de l'octopamine et également avec l'eau pour donner l'octopamine racémique. En effet l'octopamine conduit, comme on l'a vu, en milieu alcalin, dans des conditions identiques à celles de l'hydrolyse alcaline de la pandamine, au dérivé méthoxylé mais avec un faible rendement. Il faut alors supposer que la forme quinonique prendrait naissance plus difficilement à partir de l'ion phénate lui-même qu'à partir de la pandamine.

Nous n'avons pas trouvé d'interprétation précise de l'hydrolyse des ènamides intermédiaires formés. A. PATCHORNIK (54) propose le passage par une structure d'amido-carbinol ; on sait qu'un tel dérivé s'hydrolyse facilement en milieu alcalin à froid (48).

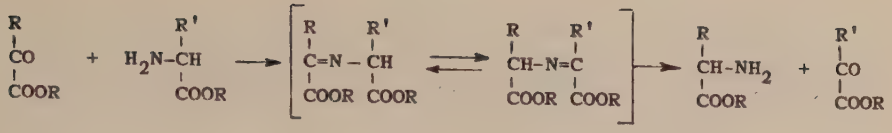


2°) l'acide cétonique formé, par transamination avec la phénylalanine, conduit à la leucine.

T. WIELAND (49) propose, pour les transaminations en milieu alcalin entre acides cétoniques et acides aminés une suite de réactions identiques à celles mises en évidence par H. M. HERBST (57) pour des transaminations s'effectuant en milieu neutre ou acide, soit la formation d'une base de Schiff qui se décarboxyle avec migration simultanée de la double liaison N= C, puis s'hydrolyse pour donner un acide aminé correspondant à l'acide cétonique de départ et un aldéhyde dérivé de l'acide aminé initial.



D'autres types de transamination qui s'effectuent sans décarboxylation en milieu alcalin dilué et impliquent une tautomérie prototropique de la base de Schiff intermédiaire ont été également décrits (58).



—La même suite de réactions, c'est-à-dire l'élimination d'un phénate et l'hydrolyse de l'ènamide, doit conduire dans l'hydrolyse alcaline de l'acide aminé 31c à l'acide cétonique, la transamination s'effectuant seulement si la phénylalanine est ajoutée au milieu. La formation de leucine en présence de phénylalanine a été effectivement démontrée ; cependant, en l'absence de phénylalanine, l'acide isopropyl-pyruvique, n'a pu être mis en évidence dans les produits de la réaction.

## INTERPRETATION DES RESULTATS DE L'HYDROLYSE ACIDE

Il reste à trouver une explication de la rupture d'une liaison C-C entre le cycle aromatique et le carbone portant la fonction alcool, au cours de l'hydrolyse acide.

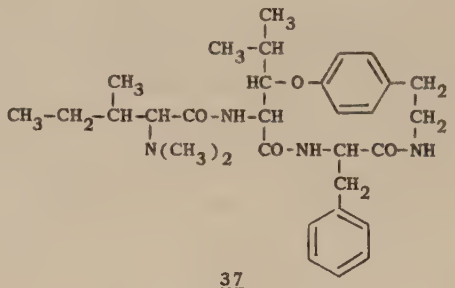
A notre connaissance, une telle coupure, dûe vraisemblablement à la présence de la fonction alcool benzylique, n'a jamais été observée. On pourrait la considérer comme l'inverse de la condensation d'un aldéhyde et d'un phénol, conduisant à un alcool, la réversibilité d'une réaction de ce type entre le formaldéhyde et le 3-5 diméthyl-phénol ayant été signalée (59).

Cependant, après action de l'acide chlorhydrique sur l'octopamine, A. CHATTERJEE (60) isole uniquement les aldéhydes juxta-nucléaires formés par une rupture en $\alpha\beta$ du noyau benzénique.

(R = H ou $CH_3$)

Il faut sans doute penser que des facteurs dûs à la structure particulière de la pandamine viennent favoriser la réaction de rupture observée.

Quoiqu'il en soit, une preuve de cette réaction et une démonstration définitive de la structure plane proposée pour la pandamine a été donnée par l'hydrolyse acide et alcaline de la désoxopandamine 37 dans laquelle le groupe CHOH est remplacé par un $CH_2$.



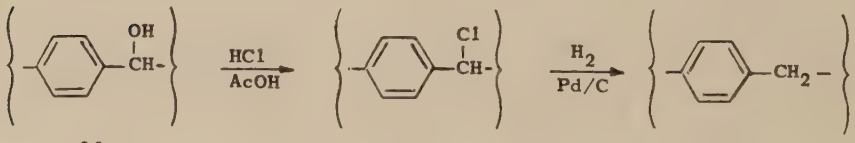
37

B - HYDROLYSE ACIDE ET ALCALINE DE LA DESOXOPANDAMINE.

Ces hydrolyses, qui ont conduit dans le cas de la pandamine à l'isolement de l'octopamine 17 et de l'acide aminé 31a, doivent conduire dans le cas de la désoxopandamine à l'isolement de la tyramine 39 et d'un amino-acide 40 résultant uniquement de la perte du reste phénylalanine.

PREPARATION DE LA DESOXOPANDAMINE

Elle est obtenue selon le schéma suivant :




36 38 37

Lors des essais d'hydrolyse acide, la pandamine avait été soumise à l'action d'un mélange à parties égales d'acide chlorhydrique et d'acide acétique à 37°. Ces conditions, trop douces, si elles n'avaient pas permis d'hydrolyser la molécule, l'avaient cependant transformée partiellement en un dérivé dans lequel l'hydroxyle de la fonction alcool secondaire était remplacé par un atome de chlore.

Cette chloropandamine 38 a été préparée par action d'un mélange d'acide chlorhydrique et d'acide acétique (80-20) à 50° sur la pandamine. Elle est séparée des autres produits de la réaction (faibles quantités de produit de départ et d'acétylpandamine) par chromatographie sur acide silicique et cristallisée dans l'acétone. Elle présente les constantes suivantes : F = 270°, $[\alpha]_D$ = -123° ($CHCl_3$, c = 1) et répond à la formule brute $C_{31}H_{43}O_4N_4Cl$.

Son spectre IR ne présente plus la bande d'absorption de la fonction alcool à 1090 $cm^{-1}$, mais une bande forte à 830 $cm^{-1}$ qui peut être attribuée à la liaison C-Cl. Son spectre de RMN montre le signal du proton en $\alpha$ du Cl à 5,40 ppm.

La désoxopandamine 37 est obtenue par hydrogénolyse de la chloropandamine en solution dans un mélange d'alcool absolu et de chlorure de méthylène (60-40), au moyen de l'hydrogène en présence de charbon palladié et de carbonate de sodium, selon une méthode décrite par K. VOEGLER (61). Après 18 heures, l'hydrogénolyse est incomplète et ne se poursuit pas plus loin. Une nouvelle hydrogénation, pendant 18 heures, en présence de catalyseur neuf, permet cependant d'obtenir un rendement quantitatif.

La désoxopandamine, F = 300°, $[\alpha]_D$ = -85° ($CHCl_3$-éthanol 80-20, c = 1) est recristallisé dans l'alcool absolu et possède la formule brute $C_{31}H_{45}O_4N_4$.

Sa structure est confirmée par la disparition de la bande d'absorption de la fonction alcool à 1090 $cm^{-1}$ ; son spectre de RMN ne montre pas de signal dans la région de 5,3 ppm.

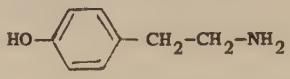
## HYDROLYSE ALCALINE DE LA DESOXOPANDAMINE. ISOLEMENT DE LA TYRAMINE 39.

L'hydrolyse pratiquée dans des conditions exactement identiques à celles utilisées pour la pandamine est impossible, la désoxopandamine étant peu soluble dans le méthanol. Le produit est mis en suspension dans un volume trois fois plus grand de solution alcaline 4 n et hydrolysé pendant 70 heures à reflux.

La chromatographie sur plaque montre qu'en fin de réaction, une faible quantité de désoxopandamine reste inchangée. Celle-ci ainsi que le N-diméthyl-isoleucinamide formé sont extraits en milieu alcalin.

L'extraction en milieu chlorhydrique permet d'éliminer les produits acides. L'analyse par chromatographie sur plaque du résidu d'évaporation de la phase aqueuse met en évidence trois produits identifiés à la leucine, à la phénylalanine et à la tyramine par comparaison avec des témoins.

La tyramine 39 est isolée par chromatographie sur résine sulfonique puis sur silice, et cristallisée dans l'alcool absolu.
Elle fond à 164° et son spectre IR est superposable à celui d'un échantillon de référence.




39

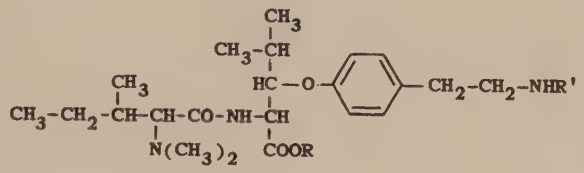
HYDROLYSE ACIDE DE LA DESOXOPANDAMINE. ISOLEMENT DE L'ACIDE AMINE 40

Après 72 heures de reflux dans un mélange acide chlorhydrique, acide acétique et eau, identique à celui utilisé pour l'hydrolyse partielle de la pandamine, l'hydrolyse n'est pas totale. Une certaine quantité de désoxopandamine peut encore être extraite en milieu alcalin. Les produits amphotères sont neutralisés sur résine sulfonique et l'acide aminé 40, nettement basique, est séparé de la phénylalanine par fixation sur résine carboxylique, suivie d'élution par l'ammoniaque. Après cristallisation dans un mélange méthanol-éther, puis dans un mélange alcool-eau, il présente les constantes suivantes : F = 248°, $[\alpha]_D$ = +9° (alcool-HCl 0,1 n 50-50, c = 1). Sa formule brute $C_{22}H_{37}O_4N_3$, 1/2 $H_2O$ est en accord avec l'hypothèse de structure formulée.

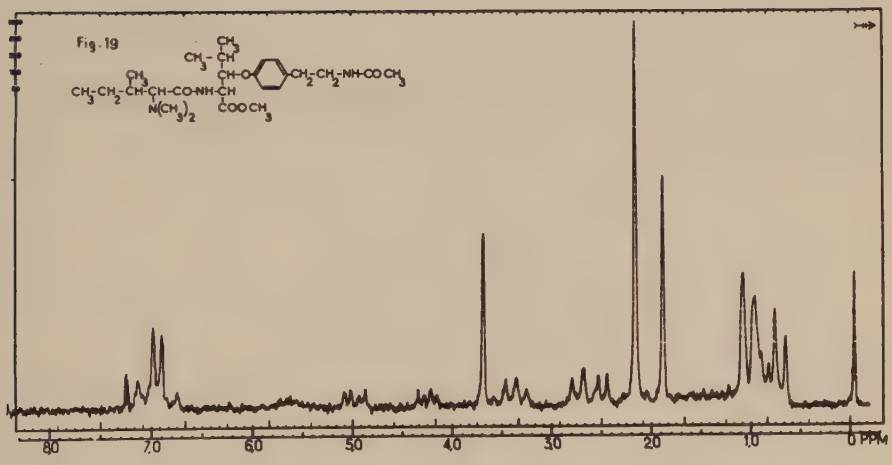
Il donne une réaction positive à la ninhydrine et l'acétylation par l'anhydride acétique dans le méthanol (62) conduit à un dérivé N-acétylé 41, F = 195°, $[\alpha]_D$ = +5° (méthanol, c = 1), de formule brute $C_{24}H_{39}O_5N_3$, ce qui démontre la présence d'une fonction amine libre.

Par chauffage à 220° sous vide poussé l'acide aminé 40 subit une décomposition thermique partielle. Le N-diméthyl-isoleucinamide a pu être isolé par sublimation des produits de pyrolyse et, d'autre part, la tyramine a été également caractérisée dans le sublimat par chromatographie sur plaque. Cette pyrolyse est donc une confirmation de la structure proposée.

Le spectre de RMN de l'ester méthylique 42, (fig. 19) obtenu par action du diazométhane sur le dérivé 41, confirme également cette structure, en particulier par les signaux d'un système $A_2B_2$ entre 6,7 et 7,2 ppm, caractéristique d'un noyau benzénique paradisubstitué et par la présence de deux triplets à 2,72 et 3,38 ppm correspondant aux groupes $CH_2$ de la chaîne tyramine.



40 R = H R' = H
41 R = H R' = $COCH_3$
42 R = $CH_3$ R' = $COCH_3$

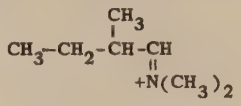



La structure plane de la pandamine est donc démontrée.

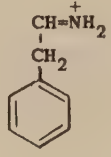
Une dernière confirmation peut être apportée par le spectre de masse.

## C - SPECTRES DE MASSE DE LA PANDAMINE ET DE L'O-ACETYLPANDAMINE

Les pics observés dans le spectre de la pandamine sont de très faibles intensité, sauf le pic principal, m/e = 114 (38 %), correspondant à l'ion.

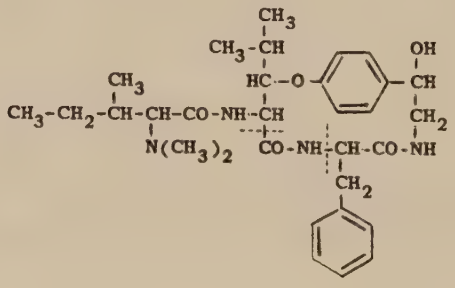


- un pic m/e = 120 (4 %), déjà trouvé dans le cas de peptides cycliques contenant de la phénylalanine (63), est attribuable à l'ion



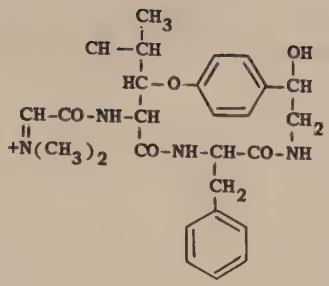
- on note un pic moléculaire faible $M^+$ = 552 et un pic un peu plus intense m/e = 550, qui correspond à la perte d'une molécule d'hydrogène. Celle-ci est probablement d'origine thermique.

- le pic m/e = 509 (M - 43) correspond à la perte de l'enchaînement -CO-NH-. Des ions de ce type ont déjà été décrits pour des peptides cycliques (63).



- le pic m/e = 491 peut être déduit du précédent par perte d'une molécule d'eau très facile en $\alpha\beta$ d'un noyau benzénique.

- le pic m/e = 495 (M - 57) peut être représenté par l'ion



- le pic m/e = 477 s'interprète à partir du pic précédent par perte d'une molécule d'eau.

Les autres pics de ce spectre n'ont pas reçu d'interprétation satisfaisante.

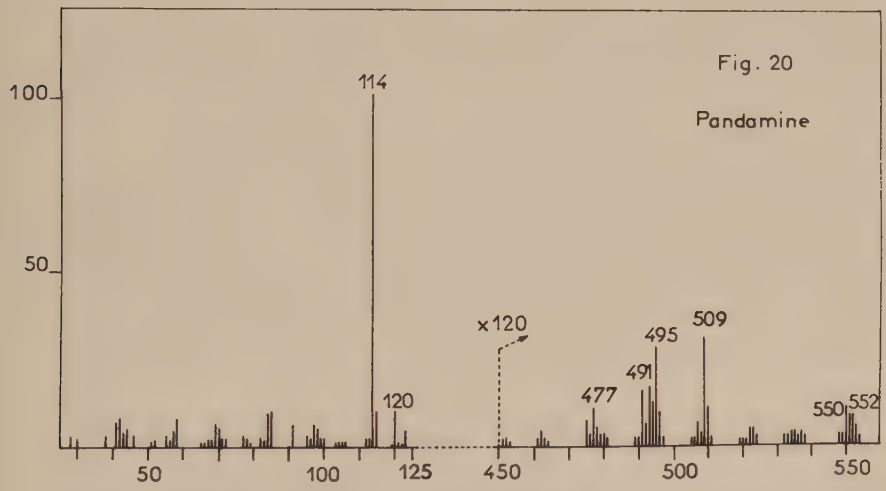



Fig. 20

Pandamine

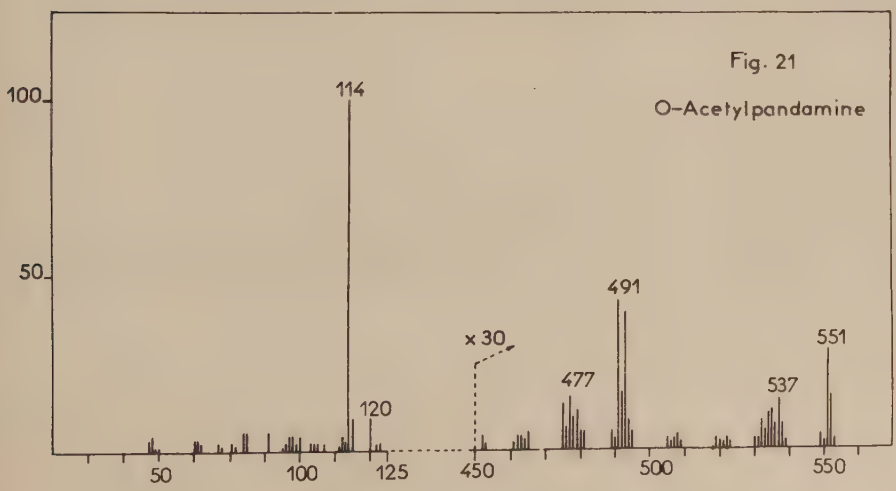



Fig. 21

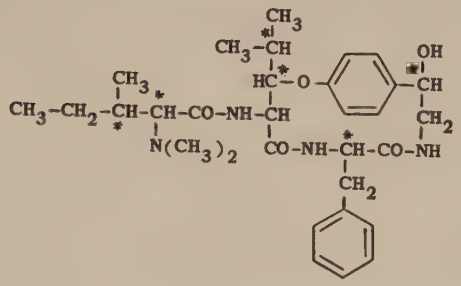
O-Acetylpandamine

Sur le spectre de l'acétylpandamine, le pic moléculaire (M = 594) n'est pas visible, mais on trouve deux pics m/e = 551 (M - 43) et m/e = 537 (M - 57), homologues des pics m/e = 509 et m/e = 495 de la pandamine.

Ce spectre montre également un pic intense m/e = 114 et des pics m/e = 120, m/e = 491, et m/e = 477, qui sont les mêmes que ceux du spectre de la pandamine. Les deux derniers s'interprètent à partir des pics m/e = 551 et m/e = 537 par perte d'une molécule de $CH_3COOH$, comparable à la perte d'eau qui conduit à ces mêmes pics à partir des ions m/e = 509 et m/e = 495 du spectre de la pandamine.

## IV - STEREOCHIMIE

La molécule de pandamine comporte six carbones asymétriques,



Sa stéréochimie pouvait être déterminée de proche en proche en attribuant une configuration absolue à chacun des quatres éléments qui constituent la molécule.

Seule la configuration de l'élément de β-hydroxyleucine n'a pu être établie. Les isomères de la β-hydroxyleucine, acide aminé déjà isolé à partir de deux antibiotiques peptidiques (64, 65) ont été décrits (65, 66) ; mais l'hydrolyse acide, méthode qui permet d'obtenir les acides aminés sans modification de leur stéréochimie, ne conduit pas à partir de la pandamine à cet acide aminé. Aucune hypothèse ne peut être formulée, car la molécule de pandamine peut être construite à partir de l'un ou l'autre des diastéréoisomères.

### Configuration absolue de l'élément de phénylalanine

Elle est déterminée par le pouvoir rotatoire de la phénylalanine obtenue en milieu acide. Ce pouvoir rotatoire montre que l'isomère isolé est de la série L.

### Configuration absolue de l'élément de N-diméthyl-isoleucine

Elle a été déduite de celle du N-diméthyl-isoleucinamide, non épimérisé, qui a pu être obtenu en faibles proportions à côté de la phénylalanine et de l'amino-acide 31c, dans l'hydrolyse acide de la pandamine en milieu acétique.

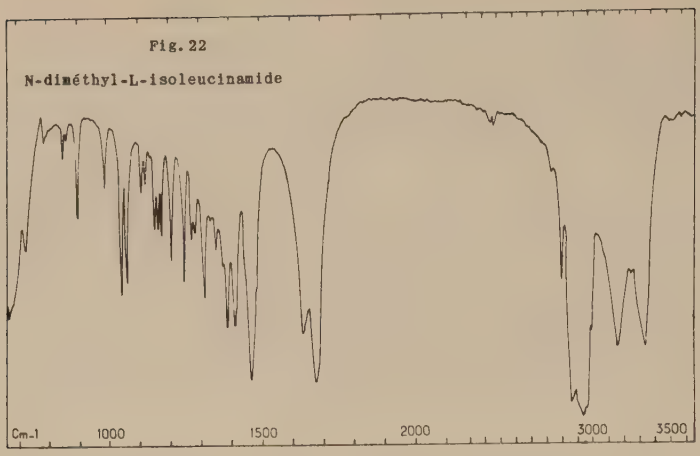
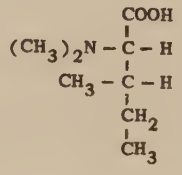



Fig. 22

N-diméthyl-L-isoleucinamide

Il ne s'agit pas du même diastéréoisomère que celui isolé à partir du mélange d'épimères obtenu dans l'hydrolyse alcaline de la pandamine. Il fond à 112° et présente un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = -5°$ ($CHCl_3$, c = 1). Son spectre IR (Nujol - fig. 22), ne montre pas les mêmes bandes dans la région de 1000 à 1300 $cm^{-1}$ et dans le spectre de RMN, le doublet du proton en $\alpha$ du groupe $N(CH_3)_2$ est légèrement déplacé à 2,58 ppm (J = 5,5c/s).

La configuration de cet N-diméthyl-isoleucinamide a pu être déterminée par identification à un produit de synthèse préparé à partir de la L-isoleucine (pure, sans allo) par une méthode stéréospécifique. Cette méthode est la même que celle décrite lors de la synthèse à partir du mélange commercial de L-isoleucine et de D-alloisoleucine.



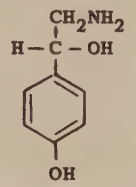
N-diméthyl-L-isoleucine
(Projection de Fischer)

Configuration absolue de l'élément d'octopamine :

L'octopamine isolée dans l'hydrolyse alcaline de la pandamine est racémisée, mais la configuration du carbone portant la fonction alcool a pu être déterminée, directement sur la pandamine, par une méthode empirique décrite par A. HOREAU (67), valable pour presque tous les alcools secondaires, et qui a toujours donné des résultats exacts dans les nombreux cas auxquels elle a été appliquée jusqu'ici.

Cette méthode est basée sur l'estérification préférentielle par l'alcool actif d'un des antipodes de l'acide $\alpha$-phényl butyrique racémique. Le pouvoir rotatoire de l'acide $\alpha$-phényl butyrique résiduel a été trouvé lévogyre, ce qui correspond à un alcool optiquement actif tel que, en projection de Fischer, l'hydroxyle soit placé à droite et l'hydrogène à gauche lorsque le groupement le plus encombré est en bas. L'expérience a montré que ce dernier groupe est toujours le phényle et le rendement optique élevé obtenu est du même ordre que celui observé dans le cas de tous les phényl alcoyl carbinols examinés.

La configuration absolue de l'élément d'octopamine de la molécule est donc représenté en projection de Fischer selon le schéma :




ce qui correspond à la D-octopamine d'après la nomenclature habituelle.

La configuration absolue de l'octopamine naturelle n'a pas été établie, mais on remarquera qu'elle est lévogyre comme le sont l'adrénaline, la Nor-adrénaline et le sympathol (ou N-méthyl-octopamine) naturels qui appartiennent tous à la série D (68, 69).

oOo

# PARTIE EXPERIMENTALE

Les points de fusion sont corrigés et pris en tube capillaire.

Les pouvoirs rotatoires ont été déterminés en microtubes de 0,05 dm avec le polarimètre électronique Jouan pour la raie D du sodium.

Les spectres IR ont été effectués sur spectrographe Infracord Perkin-Elmer ou sur Unicam SP-100.

Les spectres UV ont été déterminés en solution dans l'éthanol avec le spectrophotomètre Unicam.

Les spectres de RMN ont été effectués avec un Appareil Varian A-60, produit en solution dans $CCl_4$, $CDCl_3$, $CF_3COOH$ ou dans l'eau lourde suivant les solubilités. Les déplacements chimiques ($\delta$) sont exprimés en p.p.m., le signal du tétraméthylsilane étant pris comme zéro de référence ($\delta = 0$).

Les spectres de masse (sauf pour la pandamine et son dérivé acétylé) ont été effectués avec un spectrographe Atlas CH4. Les intensités des pics sont exprimées en pourcentage de $\Sigma$ 30.

Les chromatographies en couche mince sont éxécutées sur Kieselgel-G neutre, selon Stahl.

L'éluant utilisé pour les acides aminés et les aminophénols est une solution ammoniacale, contenant de l'ammoniaque aqueuse à 20 %, de l'alcool absolu et du chlorure de méthylène (15-40-60).

La pandamine et ses dérivés fonctionnels sont révélés sur les plaques par le réactif de Dragendorff ; les acides aminés et les aminophénols présentant un groupement amine primaire sont révélés par une solution alcoolique de ninhydrine à 0,2 %. Dans les autres cas, la révélation est obtenue par pulvérisation successive de la plaque avec le réactif de Dragendorff et une solution d'acide sulfurique à 50 %.

Le mélange silice-célite utilisé pour les chromatographies sur colonne renferme en poids deux tiers d'acide silicique Mallinckrodt et un tiers de celite 545.

La résine sulfonique Amberlite CG 120 est traitée avant emploi selon une méthode décrite par S. MOORE (70) (capacité : 1,9 milliéquivalents par cm3 de résine).

La résine carboxylique Amberlite IRC 50 (100 g en phase H), après 12 heures de gonflement dans l'eau, est introduite dans une colonne sur laquelle sont passés successivement 2 litres de solution de soude n, 3 litres d'eau, 2 litres de solution d'acide chlorhydrique n et 3 litres d'eau (capacité : 3,5 milliéquivalents par $cm^3$).

oOo

## EXTRACTION DES ALCALOIDES DU PANDA OLEOSA

17 kilog d'écorces de racine pulvérisées sont alcalinisées par une solution d'ammoniaque à 10 % et de carbonate disodique à 1 %, et épuisées à l'appareil de Soxhlet par 50 litres d'éther sulfurique. La phase organique est concentrée à 5 litres et soumise à une extraction par une solution saturée d'acide sulfamique jusqu'à réaction de Mayer négative.

La solution aqueuse, filtrée, est additionnée d'un excès d'ammoniaque. Les bases libérées sont extraites à l'éther. La première extraction est menée très rapidement, les alcaloïdes cristallisant immédiatement. Ces premiers cristaux sont recueillis. Par concentration du solvant d'autres apparaissent que l'on sépare également.

Les cristaux sont redissous dans du chlorure de méthylène contenant environ 2 % de méthanol. La solution obtenue est lavée à l'eau jusqu'à neutralité, additionnée d'éther, puis concentrée. On obtient ainsi, en 2 jets, 55 g d'alcaloïdes totaux blancs, sous forme d'une poudre microcristalline.

L'analyse par chromatographie sur plaque (éluant : chlorure de méthylène à 10 % de méthanol) montre qu'il s'agit d'un mélange. On observe deux taches très proches. La tache la plus migrée correspond à l'alcaloïde le moins polaire qui est appelé pandamine, la seconde tache moins intense correspond à un deuxième alcaloïde dénommé pandaminine.

Acétylation des alcaloïdes totaux :

12 g d'alcaloïdes totaux sont dissous dans 70 $cm^3$ de pyridine et additionnés de 50 $cm^3$ d'anhydride acétique. Après une nuit à la température ambiante, le milieu, refroidi dans la glace, est dilué à l'eau et alcalinisé à l'ammoniaque. Le précipité obtenu, essoré et lavé à l'eau jusqu'à disparition de l'odeur de pyridine, pèse 12, 710 g. Sur chromatoplaque (éluant : chlorure de méthylène à 7 % de méthanol), il donne deux taches très voisines de $R_f$ supérieur aux $R_f$ des taches données par la pandamine et la pandaminine. La plus intense, plus migrée, correspond à l'acétylpandamine et la seconde à l'acétylisopandaminine.

Chromatographie des alcaloïdes totaux acétylés :

12,710 g d'alcaloïdes acétylés sont chromatographiés sur une colonne préparée avec 540 g du mélange silice-célite.

Le produit, additionné de quelques grammes de mélange silice-célite, est mis en suspension dans du chlorure de méthylène et introduit au sommet de la colonne.

On élue par fractions de 250 $cm^3$ et chaque fraction est analysée par chromatographie sur plaque. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau :

| Solvant | Fractions | Poids brut | Chromatoplaque |
|---|---|---|---|
| $CH_2Cl_2$, $CH_3OH$ 2 % | 1-5 | 0 | |
| id. | 6-9 | 7,600 g | acétylpandamine + acétylpandaminine (faible) |
| $CH_2Cl_2$, $CH_3OH$ 4 % | 10-15 | 2,050 g | acétylpandamine + acétylpandaminine |
| id. | 16-18 | 2,354 g | acétylpandaminine + acétylpandamine (faible) |
| $CH_2Cl_2$, $CH_3OH$ 8 % | 19-25 | | |
| $CH_3OH$ | 26-30 | 0,200 g | |

La chromatographie sur plaque indique que les fractions 6-9, éluées au chlorure de méthylène à 2 % de méthanol contiennent de l'acétylpandamine mélangée à de faibles quantités d'acétylpandaminine. Les fractions suivantes (10-15), éluées au chlorure de méthylène à 4 % de méthanol sont constituées par un mélange d'acétylpandamine et d'acétylpandaminine en proportions à peu près équivalentes. En continuant l'élution par du chlorure de méthylène à 4 % de méthanol,

puis à 8 % de méthanol, on obtient ensuite des fractions (16-20) constituées surtout par de l'acétylpandaminine. Enfin, au méthanol pur, on obtient de faibles quantités de produits qui donnent sur les chromatoplaques plusieurs taches moins migrées que la tache correspondant à l'acétylpandaminine.

Les fractions 6-9 sont chromatographiées à nouveau sur une colonne de 300 g de silice-célite. On élue par fractions de 200 $cm^3$.

| Solvant | Fractions | Poids brut | Chromatoplaque |
|---|---|---|---|
| $CH_2Cl_2$ $CH_3OH$ 2 % | 1-5 | 9 | |
| id. | 6-10 | 5,200 g | acétylpandamine |
| id. | 11-13 | 0,660 g | acétylpandamine + traces d'acétylpandaminine. |
| $CH_2Cl_2$, $CH_3OH$ 50 % | 14-20 | 1,100 g | acétylpandamine + acétylpandaminine |

Les fractions 6-10 éluées par le mélange chlorure de méthylène à 2 % de méthanol sont constituées par de l'acétylpandamine pure à la chromatographie sur plaque.

Les fractions éluées au chlorure de méthylène contenant 50 % de méthanol (14-20) sont mélangées aux fractions de même type (10-15) provenant de la première chromatographie et à de nouvelles quantités d'alcaloïdes totaux acétylés pour être chromatographiées à nouveau. De même, les fractions éluées par du chlorure de méthylène à 2 % de méthanol (11-13) qui contiennent de l'acétylpandamine et des traces d'acétylpandaminine sont mélangées à des fractions équivalentes provenant des chromatographies ultérieures et purifiées.

Saponification de l'acétylpandamine.

5,200 g d'acétylpandamine sont dissous dans 500 $cm^3$ de potasse méthanolique normale. Après une nuit de contact à la température ambiante, la solution est concentrée sous vide jusqu'à un volume de 150 $cm^3$, diluée à l'eau (1 litre) et extraite par du chlorure de méthylène. La solution méthylénique est lavée à l'eau, puis avec une solution saturée de chlorure de sodium, jusqu'à neutralité, séchée sur $SO_4Na_2$ et évaporée à sec en présence d'acétone. On obtient 4,900 g de pandamine, F = 250°, sous forme d'une poudre blanche. Sur chromatoplaque, elle donne une seule tache de même $R_f$ que la tache la plus migrée du mélange d'alcaloïdes totaux initial.

## ETUDE FONCTIONNELLE DE LA PANDAMINE

Pandamine :

La pandamine est très peu soluble dans l'éther et le benzène, peu soluble dans le chloroforme et l'acétone, très soluble dans le méthanol et l'éthanol. Elle se sublime lentement à 220° sous 0,01 mm de mercure. Le produit brut de saponification de l'acétylpandamine est recristallisé deux fois dans l'acétate d'éthyle et présente les constantes suivantes : F = 256°, $[\alpha]_D$ = -103° ($CHCl_3$, c = 0,5).

Analyse pour $C_{31}H_{44}O_5N_4$ :

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | C 67,38 | H 8,09 | N 10,14 | O 14,47 |
| Tr. : | 67,29 | 7,97 | 10,11 | 14,45 |

Equivalent moléculaire (pour une molécule monobasique) :

Calculé : 552,69

Trouvé : 567 par microtitrimétrie dans le méthylcellosolve par ClH 0,001 n (pK'a = 6,02).

547 titration potentiométrique en solution dans l'acide acétique par une solution d'acide perchlorique 0,01 n dans l'acide acétique.

Spectre UV : absorption continue décroissante de 210 à 330 mμ avec deux maximums peu accentués à 230 mμ (log$\varepsilon$ 3,59) et à 277 mμ (log$\varepsilon$ 1,80).

Spectre IR (KBr-fig. 1) :

| | |
|---|---|
| bandes à 3300, 1650, 1540 $cm^{-1}$ | -CO-NH- |
| bandes à 2780, 2830, 2880 $cm^{-1}$ | $-N(CH_3)_2$ |
| bande à 3050 $cm^{-1}$ | C-H benzéniques |
| bande à 1090 $cm^{-1}$ | vibration C-O de la fonction alcool |
| bande à 1250 $cm^{-1}$ | éther aromatique |

Spectre de RMN ($CF_3COOH$ - fig. 4) : l'intégration donne 42 ± 3 protons, soit :

| | |
|---|---|
| entre 0,8 et 1,3 ppm, 12 à 13 protons | $CH_3$ aliphatiques |
| à 3,05 et 3,13 ppm, 6 protons | $-N(CH_3)_2$ |
| à 5,33 ppm, 1 proton, doublet | $-\underline{CH}-OH$ |
| entre 6,6 et 7,3 ppm, 9 à 10 protons | cycles aromatiques |

Spectre de masse (fig. 20), sur Appareil MS-9 à introduction directe :

pic $M^+$ = 552 ( < 1 %).

pics m/e = 550 ( < 1 %), 509 ( < 1 %), 495 ( < 1 %), 491 ( < 1 %), 120 (4 %), 114 (38 %).

Chlorhydrate de pandamine.

168 mg de pandamine sont dissous dans 10 $cm^3$ de méthanol. On acidifie avec de l'acide chlorhydrique 2 n jusqu'à pH 3, puis la solution est évaporée à sec. L'excès d'acide chlorhydrique est éliminé par évaporation de petites quantités d'acide ajoutées au résidu. Après deux recristallisations dans l'alcool absolu, on obtient un produit F = 235° (déc.), $[\alpha]_D$ = -77° (méthanol, c = 1)

Analyse pour $C_{31}H_{44}O_5N_4$, HCl, $H_2O$

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | C 61,32 | H 7,80 | N 9,23 | O 15,81 | Cl 5,84 |
| Tr. : | 61,37 | H 7,79 | 9,02 | 15,91 | 5,91 |

O-acétylpandamine

Le produit brut obtenu dans la chromatographie des alcaloïdes totaux est recristallisé deux fois dans le méthanol, F = 305°, $[\alpha]_D$ = -98° ($CHCl_3$, c = 0,5)

Analyse pour $C_{33}H_{46}O_6N_4$ :

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | C 66,64 | H 7,80 | N 9,42 | O 16,14 |
| Tr. : | 66,46 | 7,89 | 9,73 | 16,06 |

Equivalent moléculaire (pour une molécule monobasique) :

Calculé : 594,73

Trouvé : 613 par microtitrimétrie dans le méthylcellosolve (pK'a = 5,94).

Spectre IR (KBr-fig 2) :

| | |
|---|---|
| bandes à 3300, 1650, 1540 $cm^{-1}$ | -CO-NH- |
| bandes à 2780, 2830 et 2880 $cm^{-1}$ | $-N(CH_3)_2$ |
| bande à 3050 $cm^{-1}$ | C-H benzéniques |
| bandes à 1765 et 1240 $cm^{-1}$ | ester |

Spectre de RMN :

1 - dans $CF_3COOH$ (fig. 5a) : L'intégration donne 45 ± 3 protons, soit :

| | |
|---|---|
| entre 0,8 et 1,3 ppm, 12 à 13 protons | $CH_3$ aliphatiques |
| à 2,25 ppm, 3 protons, singulet | $-O-CO-CH_3$ |
| à 3,08 et 3,13 ppm, 6 protons | $-N(CH_3)_2$ |
| à 6,1 ppm, 1 proton, doublet | $-\underline{CH}-OCOCH_3$ |
| entre 6,6 et 7,3 ppm, 9 protons | cycles aromatiques |

2 - dans $CDCl_3$ (fig. 5b). On trouve,

| | |
|---|---|
| entre 0,75 et 1,25 ppm, 12 protons | $CH_3$ aliphatiques |
| à 2,18 ppm, un singulet | $-O-CO-CH_3$ |
| à 2,20 ppm, un singulet | $-N(CH_3)_2$ |
| entre 6,8 et 7,3 ppm, 11 protons | cycles aromatiques |

Spectre de masse (fig. 21), sur appareil MS-9 :

pics m/e = 551 ( < 1 %), 537 ( < 1 %), 491 ( < 1 %), 477 ( < 1 %), 120 (4 %), 114 (43 %).

Chlorhydrate d'O-acétylpandamine

Il est préparé comme le chlorhydrate de pandamine et cristallisé dans le méthanol. Il présente les constantes suivantes : F = 280° (déc.), $[\alpha]_D$ = -89° (méthanol, c = 1).

Analyse pour $C_{33}H_{46}O_6N_4$, HCl, $2H_2O$

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | C 59,40 | H 7,70 | N 8,39 | O 19,20 | Cl 5,31 |
| Tr. : | 59,65 | 7,86 | 8,30 | 18,71 | 5,27 |

Pandaminone

500 mg de pandamine sont dissous dans 170 $cm^3$ d'acétone. On ajoute sous agitation à la température ambiante 0,8 $cm^3$ de réactif oxydant ($CrO_3$ 26,73 g, $SO_4H_2$ 23 $cm^3$, $OH_2$ q.s.p. 100 $cm^3$). L'agitation est continuée pendant 10 mn. Le milieu est ensuite dilué à l'eau, alcalinisé à l'ammoniaque et extrait par l'acétate d'éthyle. La solution organique, lavée à l'eau et séchée sur $SO_4Na_2$, est évaporée à sec. On obtient 470 mg de produit brut qui fournissent après recristallisation dans l'alcool absolu 300 mg de pandaminone, F = 300°. Par sublimation, le point de fusion s'élève à 304°, $[\alpha]_D$ = -104° (dioxanne, c = 1).

Analyse pour $C_{31}H_{42}O_5N_4$

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | C 67,61 | H 7,69 | N 10,18 | O 14,53 |
| Tr. : | 67,48 | 7,82 | 10,47 | 14,63 |

Spectre UV : maximum à 266 mμ (log ε 3,87).

Spectre IR (KBr - fig. 3) :

| | |
|---|---|
| bandes à 3300, 1650, 1540 $cm^{-1}$ | -CO-NH- |
| bandes à 2780, 2830, 2880 $cm^{-1}$ | $-N(CH_3)_2$ |
| bande à 3050 cm-1 | C-H benzéniques |
| bande à 1720 cm-1 | C=O |

Spectre de RMN ($CF_3COOH$) :

pas de protons dans la région de 5,3 ppm.

Réduction de la pandaminone par le borohydrure de sodium.

100 mg de pandaminone sont dissous dans un mélange de 10 $cm^3$ de méthanol et de 5 $cm^3$ de tétrahydrofurane. 100 mg de borohydrure de sodium sont ajoutés par petites portions sous agitation en l'espace d'une demi-heure. L'agitation est continuée pendant 4 heures, puis le milieu réactionnel est dilué à l'eau et extrait au chlorure de méthylène. La solution organique, lavée et séchée, est évaporée à sec. Le résidu est recristallisé dans l'acétone. On obtient 60 mg d'un produit qui, sur chromatoplaque, donne deux taches très proches de même intensité, la plus migrée de même $R_f$ que la pandamine et la moins migrée de $R_f$ inférieur. Le spectre IR ne présente plus la bande cétone de la pandaminone à 1720 $cm^{-1}$. Il s'agit donc vraisemblablement d'un mélange de pandamine et de son isomère formé par épimérisation de la fonction alcool.

Essai de réduction de la pandamine par l'hydrogène dans l'alcool en présence de platine.

50 mg de pandamine, en solution dans 10 $cm^3$ d'alcool absolu, sont agités en atmosphère d'hydrogène, à la température du laboratoire, en présence de 30 mg de platine Adams. Aucune absorption d'hydrogène n'est observée. La solution alcoolique, filtrée, est évaporée sous vide en présence d'acétone. Le résidu F = 252° donne sur chromatoplaque une seule tache de même $R_f$ que la pandamine et son spectre IR est superposable à celui de la pandamine.

Essai de méthylation de la pandamine par le diazométhane.

100 mg de pandamine sont dissous dans 3 $cm^3$ de méthanol et additionnés de 10 $cm^3$ de solution éthérée de diazométhane. Après une nuit à la température ambiante, on évapore à sec en présence d'acétone. Le produit obtenu, F = 240°, donne en chromatographie sur plaque la tache caractéristique de la pandamine et son spectre IR est superposable à celui de la pandamine. Par recristallisation dans l'acétate d'éthyle, on obtient 83 mg de pandamine F = 254°.

## FUSION ALCALINE DE LA PANDAMINE

Appareil :

Il comporte un ballon de nickel auquel est fixé au moyen d'un joint d'amiante un tube à dégagement pourvu d'un renflement basal où peuvent se condenser les vapeurs. L'ensemble est entraîné dans un mouvement de rotation par un dispositif approprié. Les vapeurs non condensées sont captées dans un flacon-piège contenant une solution d'acide chlorhydrique environ 2 n.

Technique :

Un mélange de 3 g de potasse et de 3 g de soude solide est porté à 350° dans le ballon de nickel chauffé par un bain métallique. Après refroidissement on ajoute 1 g de pandamine, puis encore 4 g de potasse. Le ballon de nickel est ensuite chauffé de nouveau progressivement jusqu'à 360° en l'espace d'une demi-heure environ. Vers 250°, on observe un dégagement de vapeurs blanches, mais des traces seulement de substances se condensent dans le renflement basal du tube à dégagement.

La même opération est répétée quatre fois.

Etude des produits de dégradation :

1 - Produits basiques :

Les solutions pièges chlorhydriques sont évaporées à sec et fournissent 1,800 g d'un mélange de chlorhydrates hygroscopiques qui sont cristallisés dans le méthanol. On obtient ainsi 808 mg de chlorure d'ammonium qui sublime sans fondre vers 250° et dont le spectre IR est superposable à celui d'un échantillon de référence.

Les eaux-mères sont analysées par chromatographie sur plaque (éluant : phénol 80, eau 20). En révélant d'abord la plaque par la ninhydrine (solution à 0,2 % dans l'alcool), on obtient une tache dont le $R_f$ est identique à celui d'un témoin de chlorhydrate de méthylamine. On pulvérise ensuite la plaque ainsi colorée avec une solution alcoolique contenant 0,1 % de ninhydrine et 0,05 % d'acide ascorbique. Une tache moins migrée apparaît dont le $R_f$ est un peu plus faible que celui de la méthylamine et identique à celui d'un témoin de chlorure d'ammonium. Enfin la révélation par le réactif de Dragendorff et l'acide sulfurique permet de mettre en évidence une troisième tache de $R_f$ supérieur à celui de la méthylamine et identique à celui d'un témoin de chlorhydrate de diméthylamine.

2 - Produits acides :

Le résidu de la fusion alcaline demeuré dans le ballon métallique est dissous à chaud dans de l'eau distillée. La solution alcaline, refroidie dans la glace, est acidifiée par l'acide chlorhydrique, puis extraite à l'ether.

La phase éthérée, lavée à l'eau, est extraite à son tour par une solution de carbonate disodique à 10 %, puis lavée, séchée et évaporée à sec. Elle fournit seulement des traces de produits bruns (absence de phénols).

Les solutions carbonatées sont acidifiées et soumises à une extraction par l'éther. Les solutions éthérées, lavées à l'eau puis séchées sur $SO_4Na_2$, sont évaporées à sec et livrent 2 g de produits acides bruts.

Estérification des acides de la fusion alcaline :

Les acides, dissous dans 5 $cm^3$ de méthanol, sont additionnés d'une solution éthérée de diazométhane distillé préparé à partir de 25 g de nitrosométhylurée. Après une nuit de contact, on évapore à sec.

Le mélange d'esters obtenu est analysé par chromatographie en phase gazeuse et les trois principaux constituants séparés par chromatographie en phase gazeuse préparative.

Chromatographie en phase gazeuse analytique :

On utilise un appareil Aerograph A 90 P dans les conditions suivantes :

Colonne : acier inoxydable
longueur 1,50 m
diamètre 6 mm
phase stationnaire : 20 % de polysuccinate de diéthylèneglycol sur Chromosorb P (60-80 mesh).

Températures : colonne 210°
injecteur 310°
détecteur (catharomètre) 280°

Gaz : hélium
débit 46 $cm^3$ par mn

Les esters sont injectés sous forme d'une solution éthérée à une concentration convenable.

Immédiatement après, on injecte un mélange témoin d'esters aliphatiques normaux de $C_6$ à $C_{18}$.

Les esters étudiés donnent trois pics largement dominants pour des temps de rétention bruts de 4,03 mn, 8,02 mn et 18,38 mn. Ces temps ne coïncident avec aucun de ceux obtenus pour la solution témoin, soit, acide en $C_{10}$ 2,01 mn, en $C_{12}$ 4,21 mn, en $C_{14}$ 7,52 mn, en $C_{16}$ 14,28 mn et en $C_{18}$ 27,45 mn.

Dans les conditions utilisées, les acides aliphatiques, dont le nombre de carbones est égal ou inférieur à $C_6$ passent en même temps que l'éther, mais à plus basse température, vers 150°, on voit apparaître, sur le chromatogramme des esters étudiés, immédiatement avant et après le solvant, plusieurs pics peu intenses et mal séparés qui doivent correspondre à la présence d'un mélange d'acides volatils.

Chromatographie en phase gazeuse préparative :

On utilise le même appareil équipé avec une colonne de 3 m de long et de 9,5 mm de diamètre, contenant une phase stationnaire identique. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont les mêmes et le débit gazeux de 200 $cm^3$ par mn.

Etude analytique préliminaire : elle montre que, pour une montée progressive de la température de la colonne de 150 à 220° en 35 mn (soit 2°/mn), on obtient trois pics suffisamment séparés les uns des autres - temps de rétention 12 mn, 18,30 mn et 33 mn - pour qu'il soit possible de recueillir séparément les esters qui leur correspondent.

Chromatographie préparative : les esters bruts sont dissous dans 2 $cm^3$ d'éther et injectés en quatre fractions successives de 0,5 $cm^3$. Chaque cycle dure 35 mn et entre deux cycles qui se suivent, la colonne est refroidie de 220 à 150° en 2 mn. Le système de récupération de l'appareil est commandé par l'apparition des pics sur l'enregistreur. On recueille ainsi les 3 esters 1, 2 et 3 purs correspondants aux trois pics du chromatogramme (les temps de rétention allant en croissant quand on passe de l'ester 1 à l'ester 2, puis à l'ester 3).

Ester 1 : Benzoate de méthyle (125 mg).

Spectre de RMN ($CCl_4$) : l'intégration donne 8 protons, soit :

| | |
|---|---|
| à 3,81 ppm, 3 protons, singulet | $-COOCH_3$ |
| entre 7,20 et 8,10 ppm, 5 protons | noyau benzénique monosubstitué. |

Spectre de masse :

| | | |
|---|---|---|
| pic $M^+$ | = 136 | |
| pic m/e | = 105 | $C_6H_5-C{\equiv}O^+$ |
| | = 77 | $C_6H_5^+$ |

Ester 2 : Phénylpropionate de méthyle (102 mg)

Spectre de RMN ($CCl_4$) : il est superposable à celui d'un échantillon de référence. L'intégration donne 12 protons, soit :

| | |
|---|---|
| entre 2,30 et 3,06 ppm, 4 protons, multiplet ayant l'aspect symétrique d'un système $A_2B_2$ | $-C\underline{H}_2-C\underline{H}_2-COOH$ |
| à 3,50 ppm, 3 protons, singulet | $-COOCH_3$ |
| à 7,12 ppm, 5 protons, singulet | noyau benzénique monosubstitué. |

Spectre de masse :

| | | |
|---|---|---|
| pic $M^+$ | = 164 (5 %) | |
| pic m/e | = 133 (0,5 %) | $C_6H_5-CH_2-CH_2-C{\equiv}O+$ |
| | = 104 (55 %) | $(C_6H_5-CH{=}CH_2)+$ |
| | = 91 (17 %) | $C_6H_5-CH_2+$ |

Ester 3 : Anisate de méthyle (220 mg)

Spectre de RMN ($CCl_4$) : l'intégration donne 10 protons, soit

| | |
|---|---|
| à 3,76 et 3,80 ppm, 6 protons, deux singulets | $-COOCH_3$ et $-OCH_3$ |
| entre 6,66 et 8,03 ppm, 4 protons système $A_2B_2$ ($J_{AB}$ = 8,5 à 9 c/s) | noyau benzénique paradisubstitué. |

Spectre de masse :

| | | |
|---|---|---|
| pic $M^+$ | = 166 (15 %) | |
| pic m/e | = 135 (50 %) | $CH_3O-C_6H_4-C{\equiv}O+$ |
| | = 77 (20 %) | $C_6H_5+$ |

Saponification des esters 1, 2 et 3.

Chacun des trois esters est dissous dans 5 $cm^3$ de méthanol et additionné de 2 $cm^3$ de soude aqueuse n. Après deux heures d'ébullition à reflux, on acidifie par l'acide chlorhydrique 2 n, évapore le méthanol sous vide et extrait à l'éther. La solution éthérée, lavée à l'eau, séchée sur $SO_4Na_2$ et évaporée à sec, fournit l'acide brut.

L'acide benzoïque brut, 100 mg, est sublimé, F = 120°, non déprimé par mélange avec un échantillon de référence. Spectre IR superposable à celui de l'échantillon.

L'acide phénylpropionique brut, 88 mg, est recristallisé deux fois dans l'éther de pétrole. On obtient 29 mg d'un produit F = 47°, dont le spectre IR présente les bandes de la fonction COOH à 2650, 1700 et 930 $cm^{-1}$ et les bandes caractéristiques d'un noyau benzénique monosubstitué à 1600, 1495, 700 et 720 $cm^{-1}$.

L'acide anisique obtenu, 200 mg, F = 184° présente un spectre IR superposable à celui d'un échantillon de référence.

## HYDROLYSE ACIDE DE LA PANDAMINE

500 mg de chlorhydrate de pandamine sont mis en suspension dans 10 ml d'acide chlorhydrique 6 n. On chauffe en tube scellé pendant 24 heures à 140° avec agitation. Il se forme un précipité noir qui est éliminé par filtration (70 mg). Le filtrat est dilué à l'eau et extrait par du chlorure de méthylène. Les solutions méthyléniques, lavées, séchées et évaporées à sec fournissent 55 mg de produits acides bruns. La solution aqueuse est évaporée sous vide, l'excès d'acide chlorhydrique est chassé et le résidu, redissous dans 25 $cm^3$ d'eau, est analysé par chromatographie sur papier.

Chromatographie sur papier, selon la méthode de A. L. LEVY et D. CHUNG (16) :

Une première chromatographie, sur papier Whatman n°1, selon la méthode descendante, l'éluant étant un mélange butanol-acide-acétique-eau (4-1-5), met en évidence après 16 heures de migration à 25° et révélation par pulvérisation d'une solution de ninhydrine à 0,1 % contenant 5 % de collidine, une seule tache de même $R_f$ que les témoins de phénylalanine ou de leucine qui ne sont pas différenciés dans ces conditions. La coloration de la tache obtenue est cependant identique à celle du témoin de phénylalanine.

Deux autres chromatographies sont réalisées en deux dimensions sur papier Whatman n°1, le second solvant étant un mélange de tampon borate à pH 8,3, de phénol et de métacrésol (1-2-4) :

- pour l'une des chromatographies, on dépose au-même point 2 microlitres d'une solution aqueuse témoin de phénylalanine (concentration = 0,5 %) et 2 microlitres de la solution à étudier. On observe après développement et coloration, une seule tache.

- pour la deuxième chromatographie, la solution témoin de phénylalanine est remplacée par une solution de leucine. On observe deux taches, l'une correspondant évidemment à la leucine ajoutée, l'autre à la phénylalanine présente dans la solution à étudier.

Isolement de la L-phénylalanine :

La solution aqueuse de chlorhydrates est alcalinisée par la soude sans excès et extraite à l'éther (poids de l'extrait éthéré = 15 mg), puis passée sur une colonne contenant 15 $cm^3$ d'Amberlite CG 120 en phase acide. La résine est lavée à l'eau et les produits fixés sont élués par 75 $cm^3$ d'ammoniaque à 3 % (la concentration de cette dernière solution est exprimée en $NH_3$). La solution ammonia-

cale est évaporée à sec. Le résidu, séché sur $P_2O_5$, par digestion dans l'alcool absolu, laisse un insoluble blanc pesant 50 mg dont le spectre IR est superposable à celui de la L-phénylalanine. Par recristallisation dans l'eau, puis un mélange alcool-eau, on obtient 12 mg de L-phénylalanine F = 283° (bloc), $[\alpha]_D$ = -35° (eau, c = 1).

Hydrolyse acide de la pandamine en présence de leucine.

Deux hydrolyses sont menées parallèlement en tube scellé sur deux fois 20 mg de pandamine, mis en suspension dans 1,5 $cm^3$ d'acide chlorhydrique 6 n. Dans l'un des tubes, on a ajouté 4 mg de leucine. Après 24 heures à 140°, les mélanges réactionnels, filtrés, sont évaporés à sec, et le résidu, repris par 2 $cm^3$ de méthanol, est analysé par chromatographie sur plaque. La solution méthanolique, obtenue à partir du tube auquel la leucine a été ajoutée donne deux taches de même $R_f$ que la phénylalanine et la leucine. La deuxième solution donne une seule tache dont le $R_f$ correspond à celui de la phénylalanine, ce dernier acide aminé migrant légèrement plus loin que la leucine dans les conditions d'élution définies plus haut.

## HYDROLYSE ALCALINE DE LA PANDAMINE

3 g de pandamine sont dissous dans 40 $cm^3$ de méthanol et additionnés d'une solution de 8 g de soude en pastille dans 10 $cm^3$ d'eau. On obtient ainsi une solution alcaline environ 4 n qui est portée à l'ébullition à reflux pendant 20 heures sous azote.

1 - Extraction en milieu alcalin.

Après évaporation du méthanol sous vide, le milieu réactionnel est extrait à l'éther. La solution éthérée, lavée avec une solution saturée de chlorure de sodium et évaporée à sec, fournit 550 mg d'un produit cristallisé F = 100-130°, qui donne sur chromatoplaque une seule tache colorée en violet-mauve (éluant : chlorure de méthylène à 7 % de méthanol). Son spectre de RMN présente les caractéristiques suivantes :

- intégration 18±1 protons
  entre 0,8 et 1,1 ppm, 6 protons — $CH_3$ aliphatiques
  à 2,27 ppm, 6 protons, singulet — $-N(CH_3)_2$
  à 2,5 ppm, 1 proton, quadruplet — $-\underset{|}{C}H-NR_2$
  à 6,2 ppm, 2 protons, pic large — $-NH_2$

D-(N-diméthyl) alloisoleucinamide

Le produit brut de l'extraction en milieu alcalin est recristalisé dans l'acétone. On obtient 88 mg de D-(N-diméthyl) alloisoleucinamide, F = 160°, $[\alpha]_D$ = +9° ($CHCl_3$, c = 1). Ces constantes ne sont pas modifiées par nouvelle recristallisation.

Analyse pour $C_8H_{18}ON_2$ :

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | C 60,72 | H 11,47 | N 17,70 | O 10,11 |
| Tr. : | 60,79 | 11,27 | 17,78 | 10,21 |

Spectre IR :

1 - dans $CCl_4$ (fig. 7) :

plusieurs bandes entre 3520 et 3180 $cm^{-1}$ $-NH_2$
3 bandes entre 2780 et 2880 $cm^{-1}$ $-N(CH_3)_2$
bandes à 1795 et 1610 $cm^{-1}$ amide

2 - dans le Nujol (fig. 6) :

bandes à 3335, 3150, 1675, 1630 $cm^{-1}$ $-CONH_2$
bandes à 1265, 1250, 1198, 1170, 1150, 1118, 1100, 1055, 1040, 1020, 980 $cm^{-1}$, l'ensemble ayant un aspect caractéristique et différent du spectre du diastéréoisomère iso.

Spectre de RMN ($CDCl_3$) (fig. 8) : l'intégration donne 18 ± 1 protons soit,

entre 0,8 et 1,1 ppm, 6 protons $\underline{CH_3}-CH_2-\underset{\underline{CH_3}}{CH}-\underline{CH_3}$
à 2,30 ppm, 6 protons, singulet $-N(CH_3)_2$
à 2,50 ppm, 1 proton, doublet (J=6 c/s) $-\underset{H}{CH}-NR_2$
à 6,2 ppm, 2 protons, pic large $-NH_2$

Spectre de masse (fig. 9) :

pas de pic moléculaire
pic m/e = 114 (33 %) $CH_3-CH_2-CH(CH_3)-CH=\overset{+}{N}(CH_3)_2$
= 101 (6 %) $(CH_3)_2\overset{+}{N}=CH-CONH_2$

Synthèse du D-(N-diméthyl) alloisoleucinamide :

N-diméthyl-isoleucine (mélange de diastéréoisomères)

5 g d'une isoleucine commerciale constituée par un mélange à parties égales des deux épimères L-iso et D-allo, dissous dans 250 $cm^3$ d'un mélange de méthanol et d'eau (50-50), sont additionnés de 18 $cm^3$ de solution de formol à 30 % en présence de 5 g de charbon palladié à 10 % et hydrogénés une nuit à la température ambiante et à la pression athmosphérique. La quantité théorique d'hydrogène est absorbée. Le charbon est filtré et la solution évaporée à sec. L'excès de formol est éliminé par évaporation de petites quantités d'eau ajoutées au résidu. Le produit obtenu (5,900 g) donne sur chromatoplaque une seule

tache de $R_f$ légèrement supérieur à celui de l'isoleucine de départ. Il est recristallisé deux fois dans l'acétone et se présente sous forme d'une poudre blanche hygroscopique pesant 4,050 g, F = 115-120°.

Analyse pour $C_8H_{17}O_2N$

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | C 60,34 | H 10,76 | N 8,80 | O 20,10 |
| Tr. : | 60,03 | 10,58 | 8,54 | 20,52 |

Spectre de RMN (eau lourde) :

| | |
|---|---|
| **signaux entre 0,8 et 1,2 ppm** | **$CH_3$ aliphatiques** |
| **multiplet à 3,47 ppm** | **$-\overset{|}{C}H-NR_2$** |
| **singulet à 2,90 ppm** | **$-N(CH_3)_2$** |

D-(N-diméthyl) alloisoleucinamide

1,200 g de N-diméthyl-isoleucine sont dissous dans 20 $cm^3$ de chlorure de méthylène. A la solution, refroidie dans la glace, on ajoute 0,9 $cm^3$ de chlorocarbonate d'éthyle (1 mole) et 1 cm3 de triéthylamine. Après un contact de 30 mn pendant lesquelles on observe la formation d'un précipité cristallin, la solution est saturée d'ammoniac à 0°. Après un nouveau repos de 90 mn, on ajoute 10 $cm^3$ d'eau et extrait au chlorure de méthylène. La solution méthylénique, lavée avec une solution saturée de chlorure de sodium et séchée sur $SO_4Na_2$, est évaporée à sec. Le résidu (920 mg) donne sur chromatoplaque (éluant : chlorure de méthylène à 7 % de méthanol) deux taches, la moins migrée de même $R_f$ que le N-diméthyl-isoleucinamide et la plus migrée de même $R_f$ qu'un témoin de carbamate d'éthyle. De plus, on observe sur le spectre IR ($CCl_4$) les bandes fortes à 1330 et 1070 $cm^{-1}$ que l'on retrouve sur le spectre du carbamate d'éthyle. Ce dernier est détruit par contact une nuit avec 2 $cm^3$ d'une solution de potasse méthanolique normale. Après élimination de la plus grande partie du méthanol par évaporation sous vide, on extrait à l'éther. La solution éthérée, lavée et séchée, fournit 470 mg d'un produit, F = 100-130°, cristallisé et donnant sur plaque la tache caractéristique du N-diméthyl-isoleucinamide. Ce produit est recristallisé dans l'acétone. On obtient ainsi 72 mg de D-(N-diméthyl) alloisoleucinamide F = 160°, $[\alpha]_D$ = + 9° ($CHCl_3$, c = 1), spectre IR et spectre de RMN superposables à ceux du D-(N-diméthyl) alloisoleucinamide préparé à partir de la pandamine.

2 - Extraction en milieu acide

La solution aqueuse, après l'extraction en milieu alcalin est refroidie dans la glace, acidifiée par de l'acide chlorhydrique 6 n jusqu'à pH 2 et extraite à l'éther. La solution éthérée, lavée à l'eau et séchée sur $SO_4Na_2$, fournit 990 mg d'un mélange d'acides brun foncé.

Esters méthyliques des acides formés dans l'hydrolyse alcaline :

200 mg d'acides sont dissous dans 1 $cm^3$ de méthanol et additionnés de 20 $cm^3$ d'une solution éthérée de diazométhane. Après une nuit de contact, on évapore à sec.

Chromatographie en phase gazeuse analytique : sur Appareil Aerograph A 90 P.

Colonne : acier inoxydable
longueur 3 m
diamètre 6 mm
phase stationnaire : 20 % de polysuccinate de diéthylèneglycol sur Chromosorb P (60-80 mesh).

Températures : colonne 215°
détecteur 325°
injecteur 250°

Gaz : hélium
débit 55 $cm^3$ par mn.

Les esters sont injectés en solution dans le chloroforme. On observe sur le chromatogramme 13 pics, plus ou moins bien séparés dont les temps de rétention varient entre 1 mn et 25 mn.

3 - Produits amphotères :

a) isolement du chlorhydrate de la p-hydroxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylamine, 19 à partir du mélange de chlorhydrates de produits amphotères :

La solution aqueuse après l'extraction en milieu acide est évaporée sous vide et le résidu, séché sur $P_2O_5$, épuisé par deux fois 50 $cm^3$ d'un mélange chloroforme-alcool (85-15). La solution organique est mise à sec et les chlorhydrates obtenus, qui ne contiennent plus de chlorure de sodium, soit 1,350 g, sont cristallisés deux fois dans le méthanol-acétone, puis deux fois dans le méthanol. On obtient ainsi 120 mg d'un produit F = 186°, $[\alpha]_D = 0$.

Analyse pour $C_9H_{13}O_2N$, HCl

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | C 53,05 | H 6,93 | N 6,87 | Cl 17,45 |
| Tr. : | 53,07 | 7,05 | 6,43 | 17,48 |

Spectre IR, spectre de RMN et $R_f$ en chromatographie sur plaque identiques à ceux du chlorhydrate préparé par action de l'acide chlorhydrique sur la p-hydroxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylamine, 19 obtenue par séparation systématique des produits amphotères et décrit plus loin.

75 mg de ce chlorhydrate sont acétylés par un mélange de 1,5 $cm^3$ de pyridine et de 1 $cm^3$ d'anhydride acétique selon la méthode décrite plus bas pour l'acétylation de l'aminophénol 19 neutre. Le produit acétylé brut (60 mg) est directement sublimé, F = 60°, spectre IR, spectres de RMN et de masse superposables à ceux décrits plus loin.

35 mg de ce produit sont méthylés par 5 $cm^3$ de solution éthérée de diazométhane, en présence de 0,5 $cm^3$ de méthanol. Après 24 heures de contact, le résidu est sublimé et fournit 30 mg de p-méthoxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylamine 16, F = 67-68°, non déprimé par mélange avec le produit de synthèse, spectre IR, spectre de RMN et spectre de masse superposables à ceux décrits plus loin.

b) séparation systématique des produits amphotères :

Une deuxième opération d'hydrolyse alcaline sur 3 g de pandamine a permis d'obtenir après extraction du milieu réactionnel en milieu alcalin, puis acide, un nouveau résidu de produits amphotères et de chlorure de sodium. Ce résidu, séché sur $P_2O_5$, est épuisé par trois fois 60 $cm^3$ d'alcool absolu. Les solutions alcooliques sont évaporées à sec et fournissent un mélange de chlorhydrates, contenant encore un peu de chlorure de sodium. Ce mélange donne sur chromatoplaque quatre taches dont les $R_f$ sont respectivement identiques à ceux des témoins leucine, phénylalanine, octopamine et p-hydroxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylamine (ordre de polarité décroissant).

Il est dissous dans 100 $cm^3$ d'eau et la solution est passée sur une colonne contenant 40 $cm^3$ d'Amberlite CG 120 en phase acide. La résine est lavée avec 300 $cm^3$ d'eau, puis les produits fixés sont élués par une solution d'ammoniaque à 3 % (500 $cm^3$).

La solution ammoniacale est évaporée à sec. Le résidu (1,500g), dissous dans 100 $cm^3$ d'eau, est passé sur une colonne d'Amberlite IRC 50 de 10 $cm^3$ en phase acide. On lave avec 100 $cm^3$ d'eau. La solution recueillie et les eaux de lavage réunis à sec fournissent 740 mg d'un mélange d'amino-acides qui donne sur chromatoplaque deux taches de même $R_f$ que la phénylalanine et la leucine, la tache correspondant à ce dernier acide aminé étant nettement plus petite.

Les produits restés fixés sur la colonne sont élués par 100 $cm^3$ de solution ammoniacale à 3 % et pèsent 680 mg. Sur plaque, ils donnent les deux taches de l'octopamine et de la p-hydroxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylamine, cette dernière beaucoup plus intense.

Chromatographie des acides aminés sur papier

Selon la méthode de S. LISSITZKY et G. LAURENT (32), qui permet de différencier en une seule dimension la phénylalanine, la leucine et l'isoleucine (en chromatographie sur plaque, dans les conditions utilisées, la leucine et l'isoleucine ont des $R_f$ identiques).

On place sur une feuille de papier Whatman n°1 10 µg de chacun des acides aminés (2 microlitres d'une solution aqueuse à 0,5 %) et 4 microlitres d'une solution du mélange à étudier dans 40 $cm^3$ d'acide acétique aqueux à 5 %. La chromatographie est réalisée selon la méthode descendante avec comme solvant l'alcool amylique tertiaire saturé d'eau en athmosphère de diéthylamine. La migration est poursuivie 4,5 jours à 18°. Les acides aminés sont révélés par pulvérisation d'une solution de ninhydrine à 0,2 % dans l'alcool. La solution étudiée donne deux taches de même $R_f$ que les témoins leucine et phénylalanine.

Isolement des acides aminés :

Une solution des acides aminés (740 mg) dans 70 $cm^3$ d'acide acétique à 5 % est passée sur une colonne contenant un mélange de 10 g de charbon activé (lavé au préalable avec une solution aqueuse d'acide nitrique à 10 % et séché 48 heures à 120°) et de 5 g de célite 545, montée avec le même solvant. On élue par une solution d'acide acétique à 5 % puis à 25 %. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

| Fraction | Solvant | Volume | Poids brut | Chromatoplaque |
|---|---|---|---|---|
| 1 | solution aqueuse d'acide acétique à 5 % | 160 $cm^3$ | 0,090 g | leucine |
| 2 | id. | 160 $cm^3$ | 0,022 g | phénylalanine + leucine (faible) |
| 3 | solution aqueuse d'acide acétique à 25 % | 400 $cm^3$ | 0,518 g | phénylalanine |
| 4 | id. | 400 $cm^3$ | 0,040 g | phénylalanine |

Au total, on recueille donc 670 mg. Le déficit observé est dû à une perte en phénylalanine dont une partie ne peut être éluée de la colonne comme le montrent des essais témoins effectués avec un mélange de 70 mg de DL-leucine et de 700 mg de DL-phénylalanine, essais qui ont permis par ailleurs de déterminer la quantité minimum de charbon nécessaire pour retenir la phénylalanine.

La fraction 1 présente un spectre IR superposable à celui d'un échantillon de DL-leucine. Pour analyse, le produit est recristallisé dans un mélange alcool-eau, puis sublimé, $[\alpha]_D = 0$

Analyse pour $C_6H_{13}O_2N$

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | C 54,94 | H 9,99 | N 24,39 | O 10,68 |
| Tr. : | 55,14 | 9,78 | 24,40 | 10,71 |

La fraction 3 dont le spectre IR est superposable à celui d'un échantillon de DL-phénylalanine, est de même recristallisée dans l'alcool-eau et sublimée, $[\alpha]_D = O$

Analyse pour $C_8H_{11}O_2N$

| | C | H | N | O |
|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | 65,44 | 6,71 | 8,48 | 19,37 |
| Tr. : | 65,42 | 6,76 | 8,72 | 19,71 |

Isolement des aminophénols :

Les aminophénols bruts (680 mg) élués de la colonne d'Amberlite IRC 50 par l'ammoniaque sont chromatographiés sur 20 g de silice-célite. L'éluat est recueilli par fractions de 50 $cm^3$ et chaque fraction est analysée par chromatographie sur plaque.

| Solvant | Fractions | Poids brut | Chromatoplaque |
|---|---|---|---|
| $CH_2Cl_2$, $CH_3OH$ 20 % | 1 | 0,056 g | aminophénol 19 |
| id. | 2-4 | 0,416 g | id. |
| id. | 5-6 | 0,104 g | aminophénol 19 + octopamine |
| $CH_2Cl_2$, $CH_3OH$ 40 % | 7 | 0,090 g | octopamine |
| méthanol | 8 | 0,010 g | octopamine |

Les fractions 2 à 4 et la fraction 7 conduisent aux aminophénols purs. Les fractions 1, 5, 6 et 8 sont colorées en brun. Elles contiennent, en plus des aminophénols, révélés sur les chromatoplaques par la ninhydrine, des produits mal définis qui donnent sur les plaques des taches qui apparaissent seulement après révélation au réactif de Dragendorff-acide sulfurique.

p-hydroxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylamine, 19.

Les fractions 2-4 sont constituées par un produit blanc cristallisé F = 145°. Par recristallisation dans l'alcool absolu, on obtient 280 mg de l'aminophénol 19, F = 145°, $[\alpha]_D = O$

Analyse pour $C_9H_{13}O_2N$

| | C | H | N | O |
|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | 64,65 | 7,84 | 8,38 | 19,19 |
| Tr. : | 64,40 | 7,88 | 8,32 | 19,21 |

Spectre UV : deux maximums à 226 mμ ($\log \varepsilon$ 4,07) et à 277 mμ ($\log \varepsilon$ 3,25), déplacés en milieu alcalin à 248 et 295 mμ.

Spectre IR (Nujol) :

bandes à 3340, 3275, 2700 (large) et 1800 (large) $cm^{-1}$, dûes à la présence simultanée des groupes $NH_2$ et OH.

bandes à 1600, 1510 et 840 $cm^{-1}$ noyau benzénique paradisubstitué.

Spectre de masse (fig. 11) :

| | | | |
|---|---|---|---|
| pic $M^+$ | = 167 | ( < 1 %) | |
| pic m/e = | 137 | ( 20 % ) | $HO\text{-}C_6H_4\text{-}CH=\overset{+}{O}CH_3$ |
| | 91 | ( 3 % ) | $C_6H_5\text{-}\overset{+}{C}H_2$ |
| | 30 | ( 5 % ) | $CH_2=\overset{+}{N}H_2$ |

Chlorhydrate de p-hydroxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylamine

Il est préparé selon la méthode décrite pour le chlorhydrate de pandamine à partir de 100 mg de p-hydroxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylamine. Le produit brut est cristallisé dans le méthanol-acétone, puis dans le méthanol. On obtient 32 mg de chlorhydrate, F = 186° (déc.), $[\alpha]_D$ = O.

Spectre de RMN (eau lourde - fig. 10).

| | |
|---|---|
| singulet à 3,22 ppm | $-OCH_3$ |
| doublet à 3,18 ppm (J = 6 à 7 c/s) (une raie cachée par le pic $OCH_3$) | $-C\underline{H}_2\text{-}NH_2$ |
| triplet à 4,45 ppm (J = 6,5 c/s) | $-C\underline{H}\text{-}OCH_3$ |
| système $A_2B_2$ entre 6,8 et 7,4 ppm ($J_{AB}$ = 8,5 à 9 c/s) | noyau benzénique paradisubstitué. |

p-acétoxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylacétamide, 20.

200 mg de p-hydroxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylamine, 19 sont dissous dans un mélange de 5 $cm^3$ de pyridine et 5 $cm^3$ d'anhydride acétique. Après une nuit à la température ambiante, on dilue à l'eau, alcalinise par $CO_3HNa$ jusqu'à pH 7 et extrait à l'éther. La solution éthérée est lavée à l'eau, puis par une solution d'acide chlorhydrique dilué et de nouveau à l'eau. On sèche sur $SO_4Na_2$ et évapore à sec. Le produit obtenu est recristallisé deux fois dans un mélange acétone et éther de pétrole, puis sublimé, F = 72°, $[\alpha]_D$ = O.

Analyse pour $C_{13}H_{17}O_4N$.

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | C 62,14 | H 6,82 | N 5,57 | O 25,47 |
| Tr. : | 62,23 | 6,98 | 5,43 | 25,81 |

Spectre IR (Nujol) :

| | |
|---|---|
| bandes à 3200, 1650 et 1550 $cm^{-1}$ | -CO-NH- |
| bandes à 1760 et 1210 $cm^{-1}$ | ester |
| bandes à 1600, 1500 et 920 $cm^{-1}$ | noyau benzénique paradisubstitué |

Spectre de RMN ($CDCl_3$) (fig. 12).

| | |
|---|---|
| singulet à 1,95 ppm | $-NH-CO-C\underline{H}_3$ |
| singulet à 2,25 ppm | $-O-CO-CH_3$ |
| singulet à 3,25 ppm | $-O-CH_3$ |
| multiplet entre 3,0 et 3,9 ppm | $-C\underline{H}_2-NH-$ |
| quadruplet à 4,30 ppm | $-C\underline{H}-OCH_3$ |
| pic large à 6,2 ppm | $-CO-NH-$ |
| système $A_2B_2$ entre 6,9 et 7,7 ppm ($J_{AB}$ = 8,5 à 9 c/s) | noyau benzénique paradisubstitué. |

Spectre de masse (fig. 13).

| | |
|---|---|
| pic $M^+$ = 251 (< 1 %) | |
| pic m/e = 179 (10 %) | $CH_3COO-C_6H_4-CH=\overset{+}{O}CH_3$ |
| = 137 (31 %) | $HO-C_6H_4-CH=\overset{+}{O}CH_3$ |

p-méthoxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylacétamide, 16.

150 mg de dérivé acétylé sont dissous dans 1 $cm^3$ de méthanol et additionnés de 10 $cm^3$ de solution éthérée de diazométhane. Après une nuit de contact, on évapore à sec. Le résidu est cristallisé dans un mélange chlorure de méthylène-hexane, puis sublimé, F = 70°, $[\alpha]_D$ = O.

Analyse pour $C_{12}H_{17}O_3N$

| | C | H | N | O |
|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | 64,55 | 7,68 | 6,27 | 21,50 |
| Tr. : | 64,43 | 7,71 | 6,59 | 21,57 |

Spectre IR (Nujol) :

| | |
|---|---|
| bandes à 3200, 1650, et 1550 $cm^{-1}$ | -CO-NH- |
| bandes à 1600, 1500 et 835 $cm^{-1}$ | noyau benzénique paradisubstitué |
| bande à 1240 $cm^{-1}$ | éther aromatique |

Spectre de RMN ($CDCl_3$) :

| | |
|---|---|
| singulet à 1,95 ppm | $-NH-COC\underline{H}_3$ |
| singulet à 3,80 ppm | $-OCH_3$ aromatique |
| singulet à 3,22 ppm | $-OCH_3$ aliphatique |
| multiplet entre 3,0 et 3,9 ppm | $-C\underline{H}_2-NH-$ |
| quadruplet à 4,20 ppm | $-C\underline{H}-OCH_3$ |
| pic large à 5,9 ppm | $-NH-CO-$ |
| système $A_2B_2$ entre 6,9 et 7,4 ppm ($J_{AB}$ = 8,5 à 9 c/s) | noyau benzénique paradisubstitué. |

Spectre de masse (fig. 14) :

| | |
|---|---|
| pic $M^+$ = 223 (< 1 %) | |
| pic m/e = 151 (10 %) | $CH_3O-C_6H_4-CH=\overset{+}{O}CH_3$ |

Synthèse du p-méthoxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylacétamide, 16 :

Chlorhydrate de p-méthoxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylamine, 24

960 mg de p-méthoxy-phényl-2 méthoxy-2 nitroéthane 23 bruts préparés à partir de 1,200 g de p-méthoxy-nitrostyrène, F = 87°, 22 (36) sont dissous dans 15 $cm^3$ d'éther anhydre. Dans la cartouche du Soxhlet on introduit 1 g d'hydrure d'aluminium-lithium et chauffe à reflux pendant 1,30 heure. On détruit l'excès d'hydrure par de l'éther saturé d'eau, puis par quelques gouttes d'eau. Le précipité d'alumine est essoré sur Schott et lavé à l'éther. Les solutions éthérées, lavées à l'eau, séchées sur $SO_4Na_2$ et évaporées à sec, fournissent 900 mg de base brute qui sont dissous dans le méthanol. On acidifie par l'acide chlorhydrique, puis l'excès d'acide est chassé et le résidu d'évaporation recristallisé dans le méthanol-acétone. On obtient 310 mg de produit F = 173° (déc.). Par recristallisation dans l'alcool absolu le point de fusion s'élève à 180° (déc.).

Analyse pour $C_{10}H_{16}O_2N$, HCl, $H_2O$

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | C 50,96 | H 7,69 | N 5,95 | O 20,36 | Cl 15,04 |
| Tr. : | 51,14 | 7,66 | 5,80 | 20,69 | 15,22 |

Spectre IR (Nujol) :

| | |
|---|---|
| bandes à 1600, 1500 et 830 $cm^{-1}$ | noyau benzénique paradisubstitué. |
| bande à 1240 $cm^{-1}$ | éther aromatique |

Spectre de RMN (eau lourde) :

| | |
|---|---|
| singulet à 3,26 ppm | $-OCH_3$ aliphatique |
| doublet à 3,22 ppm (J = 6 à 7 c/s) (une raie cachée par le pic $OCH_3$) | $-CH_2-NH_2$ |
| triplet à 4,53 ppm (J = 7 c/s) | $-CH(-)-OCH_3$ |
| système $A_2B_2$ entre 6,9 et 7,5 ppm ($J_{AB}$ = 8,5 à 9 c/s) | noyau benzénique paradisubstitué |

p-méthoxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylacétamide, 16

80 mg de chlorhydrate de p-méthoxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylamine 24 sont dissous dans 2 $cm^3$ de pyridine et additionnés de 1 $cm^3$ d'anhydride acétique. Après une nuit de contact à la température ambiante, on dilue à l'eau, alcalinise par $CO_3Na_2$ et extrait à l'éther. La solution éthérée, lavée à l'eau, à l'acide chlorhydrique dilué, puis de nouveau à l'eau, est séchée sur $SO_4Na_2$ et évaporée à sec. Le résidu est recristallisé dans le chlorure de méthylène-hexane, puis sublimé F = 70°, $[\alpha]_D$ = O

Spectre IR et spectre de RMN superposables à ceux du produit préparé à partir de la pandamine.

Octopamine ou p-hydroxy-phényl-2 hydroxy-2 éthylamine, 17

La fraction 7 de la chromatographie des aminophénols est recristallisée dans l'alcool absolu. On obtient 25 mg d'octopamine F = 154-156° (déc.). Par sublimation, le point de fusion s'élève à 161°, non déprimé par mélange avec un échantillon de synthèse ; $[\alpha]_D = 0$.

Spectre UV : deux maximums à 226 mμ ($\log \varepsilon$ 4,59) et 277 mμ ($\log \varepsilon$ 3,34) ; sur un spectre effectué dans l'acide chlorhydrique 0,1 n, ces maximums sont déplacés légèrement à 222 et 273 mμ.

Spectre IR (Nujol) :

bandes à 3340, 3270, 2450 (large) et 1900 (large) $cm^{-1}$, dûes à la présence simultanée des groupes $NH_2$ et OH

bandes à 1605, 1500 et 830 $cm^{-1}$ noyau benzénique paradisubstitué.

Spectre de masse:

pas de pic moléculaire

pic m/e = 135 (9 %) $[HO\text{-}C_6H_4\text{-}CH{=}CH\text{-}NH_2]^+$

= 107 (7 %) $HO\text{-}C_6H_4\text{-}CH_2^+$

= 77 (4 %) $C_6H_5^+$

Synthèse de l'octopamine, 17 :

Méthylène-acétonitrile, 25

Il est préparé selon une méthode décrite dans Org. Synth., Coll. Vol. I, p. 355. A partir de 84 g de CNNa, 65,550 g de produit F = 129° ont été obtenus.

Chlorhydrate d'aminoacétonitrile, 26

Selon T. CURTIUS (71). 13,6 g de méthylène-acétonitrile fournissent 11,690 g de produit, F = 165° (déc.).

Chlorhydrate de p-hydroxy-ω-aminoacétophénone, 28

7 g de phénol sont condensés avec 3,920 g de chlorhydrate d'amino-acétonitrile dans le nitrobenzène en présence de $Cl_3Al$ selon le mode opératoire décrit par M. ASSCHER (38). On obtient 6,035 g de p-hydroxy-ω - aminoacétophénone (chlorhydrate), F = 251°.

Chlorhydrate de p-hydroxy-phényl-2 hydroxy-2 éthylamine.

3 g de chlorhydrate p-hydroxy-ω-aminoacétophénone, 28 sont dissous dans un mélange de 40 $cm^3$ d'alcool et de 10 $cm^3$ d'eau en présence de 500 mg de charbon palladié à 10 % et hydrogénés une nuit à la pression athmosphérique. La quantité théorique d'hydrogène est absorbée. Le catalyseur est éliminé par filtration et la solution évaporée à sec. Le résidu est recristallisé dans le méthanol-éther. On obtient 2,370 g de produit, F = 175° (déc.).

Spectre de RMN (eau lourde) :

| | |
|---|---|
| doublet à 3,23 ppm (J = 7 c/s) | $-C\underline{H}_2-NH_2$ |
| triplet à 4,93 ppm (J = 7 c/s) | $-C\underline{H}(OH)-$ |
| système $A_2B_2$ entre 6,8 et 7,5 ppm ($J_{AB}$ = 8,5 à 9 c/s) | noyau benzénique paradisubstitué. |

Octopamine 17

600 mg de chlorhydrate de p-hydroxy-phényl-2 hydroxy-2 éthylamine sont dissous dans 60 cm3 d'eau et la solution passée sur une colonne contenant 10 $cm^3$ d'Amberlite CG 120 en phase acide. La colonne est lavée avec 150 $cm^3$ d'eau et éluée par 100 $cm^3$ d'ammoniaque à 3 %. La solution ammoniacale est évaporée à sec et le résidu cristallisé dans l'alcool absolu. On obtient 410 mg d'octopamine F = 159°. Par sublimation le point de fusion s'élève à 161°.

Analyse pour $C_8H_{11}O_2N$

| | C | H | N | O |
|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | 62,72 | 7,24 | 9,14 | 20,89 |
| Tr. : | 62,93 | 7,35 | 8,92 | 20,76 |

Spectre IR, spectre de RMN et spectre de masse superposables à ceux de l'octopamine isolée à partir de la pandamine.

Action de la soude méthanolique sur l'octopamine :

720 mg de chlorhydrate d'octopamine sont dissous dans 10 $cm^3$ de méthanol et additionnés d'une solution de 2 g de soude en pastille dans 2,5 $cm^3$ d'eau. On porte à ébullition à reflux sous azote pendant 20 heures, puis on évapore le méthanol sous vide et ajoute 40 $cm^3$ d'eau. La solution est passée sur une colonne de 40 $cm^3$ d'Amberlite CG 120 en phase acide. La résine est lavée à l'eau. Les produits fixés sont élués par 200 $cm^3$ d'ammoniaque à 3 %, mis à sec et analysés par chromatographie sur plaque. On observe, en plus de la tache qui correspond à l'aminophénol de départ, une deuxième tache petite et faiblement colorée de même $R_f$ que la p-hydroxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylamine, 19. On chromatographie sur 18 g de mélange silice-célite. L'éluat est recueilli par fraction de 30 $cm^3$ et chaque fraction est analysée sur plaque.

| Solvant | Fractions | Poids brut | Chromatoplaque |
|---|---|---|---|
| $CH_2Cl_2$, $CH_3OH$ 20 % | 1-4 | 0,020 g | aminophénol 19 |
| id. | 5 | 0,010 g | id. |
| id. | 6 | 0,025 g | aminophénol 19 + octopamine |
| id. | 7-12 | 0,345 g | octopamine |
| $CH_2Cl_2$, $CH_3OH$ 40 % | 13-14 | 0,073 g | id. |
| méthanol | 15-18 | 0,087 g | id. |

Les fractions 1-4, 6 et 13-18 contiennent, en plus des aminophénols, des produits qui ne se colorent pas par la ninhydrine mais qui sont révélés sur les plaques par le réactif de Dragendorff-acide sulfurique.

La fraction 5, F = 143°, est recristallisée dans l'alcool absolu. On obtient 2 mg de l'aminophénol 19, F = 145°, spectre IR superposable à celui d'un échantillon.

Les fractions 7-12 sont recristallisées dans l'alcool absolu et fournissent 224 mg d'octopamine F = 159°.

## HYDROLYSE ACIDE PARTIELLE DE LA PANDAMINE

A 3 g de pandamine, dissous dans 75 $cm^3$ d'acide acétique, on ajoute 75 $cm^3$ d'eau et 150 $cm^3$ d'acide chlorhydrique concentré. On porte à ébullition à reflux pendant 16 heures sous azote et évapore à sec. Le résidu est redissous dans 40 à 50 $cm^3$ de méthanol, additionné de 20 à 30 $cm^3$ de benzène et évaporé à sec de nouveau. On répète ces opérations plusieurs fois jusqu'à disparition de l'odeur d'acide chlorhydrique. Finalement, on reprend le résidu à l'eau et alcalinise par l'ammoniaque. Il se forme un précipité de produits bruns résineux qui sont séparés par filtration et pèsent 600 mg.

Produits extractibles en milieu alcalin :

La solution aqueuse est extraite au chlorure de méthylène. Les solutions organiques, lavées à l'eau et séchées sur $SO_4Na_2$, sont évaporées à sec. L'extrait méthylénique (0,450 g) est analysé sur chromatoplaque (éluant : chlorure de méthylène à 7 % de méthanol). On observe plusieurs taches de $R_f$ supérieur, identique ou inférieur à celui de la pandamine ainsi qu'une tache faible de même $R_f$ et de même coloration que le N-diméthyl-isoleucinamide.

Chromatographie sur 20 g de silice-célite : on élue par du chlorure de méthylène contenant des quantités croissante de méthanol (1 à 8 %). Les fractions éluées par le chlorure de méthylène à 5 % de méthanol (250 mg) sont cristallisées dans l'acétone et fournissent 150 mg d'un mélange qui donne sur plaque deux taches très voisines de $R_f$ respectivement identique et légèrement inférieur à celui de la pandamine et dont le spectre IR est superposable à celui du produit obtenu par réduction de la pandaminone par le borohydrure de sodium.

Produits amphotères :

Les produits restés en solution aqueuse après extraction en milieu ammoniacal par le chlorure de méthylène sont mis à sec et le résidu repris par 150 $cm^3$ d'eau. On acidifie par l'acide chlorhydrique jusqu'à pH 3 de façon à obtenir une solution limpide qui est passée sur une colonne de 40 $cm^3$ d'Amberlite CG 120 en phase acide, cette quantité de résine nettement supérieure à la théorie étant nécessaire pour retenir complètement l'acide aminé 31c. La résine est ensuite lavée avec 300 $cm^3$ d'eau. La solution passée et les eaux de lavage évaporés à sec ne fournissent que des traces de produits brun foncé (absence de produits acides).

Les produits fixés sur la colonne de résine sont élués par 900 $cm^3$ d'ammoniaque à 3 %. La solution alcaline est évaporée à sec. Le résidu (1,706 g) donne sur chromatoplaque après révélation par la ninhydrine une seule tache de même $R_f$ que la phénylalanine et après révélation par le réactif de Dragendorff-acide sulfurique une tache principale nettement plus migrée que la tache donnée par la phénylalanine et qui correspond à l'acide aminé 31c.

L-phénylalanine

On sèche sur $P_2O_5$ le mélange de produits amphotères élués de la colonne de résine par l'ammoniaque, puis laisse digérer quelques minutes dans l'alcool absolu. On obtient un insoluble blanc pesant 325 mg dont le spectre IR est superposable à celui de la L-phénylalanine.

Amino-acide 31c.

Les produits solubles dans l'alcool sont chromatographiés sur 42 g de silice-célite. L'éluat est recueilli par fractions de 70 $cm^3$ et chaque fraction analysée par chromatographie sur plaque.

| Solvant | Fractions | Poids brut | Chromatoplaque (tache principale) |
|---|---|---|---|
| $CH_2Cl_2$ $CH_3OH$ 10 % | 1-5 | 0,640 g | amino-acide 31 c |
| $CH_2Cl_2$, $CH_3OH$ 20 % | 6-9 | 0,139 g | amino-acide 31 c + N-diméthyl-isoleucinamide. |
| $CH_2Cl_2$, $CH_3OH$ 50% | 10-12 | 0,284 g | phénylalanine |
| méthanol | 13-14 | 0,312 g | id. |

Les fractions 1-5 sont recristallisées dans le méthanol-éther, puis dans le méthanol et fournissent 320 mg d'amino-acide 31c, F = 217°; $[\alpha]_D$ = + 19° ($CH_2Cl_2$-méthanol 50-50, c = 1).

Analyse pour $C_{20}H_{32}O_4N_2$

| | C | H | N | O |
|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | 65,90 | 8,85 | 7,69 | 17,56 |
| Tr. % : | 65,92 | 9,09 | 7,87 | 17,84 |

Spectre UV : deux maximums à 225 mμ (log ε 4,02) et à 275 mμ (log ε 3,13), non déplacés en milieu alcalin.

Spectre IR (Nujol) :

| | |
|---|---|
| bandes à 3200, 1670 et 1550 $cm^{-1}$ | -CO-NH- |
| bande à 1600 $cm^{-1}$ | $COO^-$ |
| bandes à 1495 et 750 $cm^{-1}$ | noyau benzénique monosubstitué |
| bande à 1245 $cm^{-1}$ | éther aromatique |

Spectre de masse (fig. 17) :

pas de pic moléculaire
pic m/e = 252 ( <1%), 195 (1 %), 167 (1%), 114 (10%), 94 (20 %).

Ester méthylique de l'acide aminé 31c.

200 mg d'amino-acide 31c sont dissous dans un mélange de 2 $cm^3$ de méthanol et de 2 $cm^3$ de chlorure de méthylène, puis additionnés de 10 $cm^3$ de solution éthérée de diazométhane. Après une nuit à la température ambiante, on évapore à sec. Le résidu est chromatographié sur 6 g d'alumine. On élue en tête au benzène 180 mg d'ester cristallisé F = 75°. Après deux recristallisations dans l'hexane, le point de fusion s'élève à 82°, $[\alpha]_D$ = + 9 ($CHCl_3$, c = 1).

Analyse pour $C_{21}H_{34}O_4N_2$

| | C | H | N | O |
|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | 66,63 | 9,05 | 7,40 | 16,91 |
| Tr. : | 66,72 | 9,12 | 7,61 | 16,94 |

Spectre IR ($CCl_4$) :

bandes à 3440, 3385 et 1695 $cm^{-1}$ amide
bande à 1755 $cm^{-1}$ ester

Spectre de RMN ($CDCl_3$ - fig. 15a -) : l'intégration donne 35 ± 1 proton, soit,

entre 0,6 et 1,2 ppm, 12 à 13 protons
dont à 0,72 ppm, 3 protons, doublet (J = 6,5 c/s) $\underline{CH}_3\text{-}CHR_2$
à 1,08 ppm, 6 protons, doublet (J = 6,5 c/s) $(\underline{CH}_3)_2\text{-}CH\text{-}$
à 2,20 ppm, 6 protons, singulet $\text{-}N(CH_3)_2$
à 2,53 ppm, 1 proton, doublet (J = 5 c/s) $\text{-}\underline{C}H\text{-}NR_2$
à 3,71 ppm, 3 protons, singulet $\text{-}COOCH_3$
à 4,33 ppm, 1 proton, quadruplet (J=4, J'=7,5 c/s) $\text{-}\underline{C}H\text{-}O\text{-}Ar$
à 5,03 ppm, 1 proton, quadruplet (J=4, J"=8,7 c/s) $\text{-}\underline{C}H\text{-}NH\text{-}$
entre 6,85 et 7,43 ppm, 6 protons -CO-NH- et noyau benzénique monosubstitué.

Deutération : la solution de l'ester dans le deutérochloroforme est agitée pendant une heure avec de l'eau lourde. Les spectres partiels représentés sur la figure 15 b ont été effectués avec un appareil Varian A-100.

Spectre de masse :

pas de pic moléculaire
pics m/e = 252 ( < 1 %), 195 (1 %), 167 (1 %), 114 (15 %), 94 (10 %).

Alcool 32.

120 mg d'ester sont dissous dans 15 $cm^3$ d'éther anhydre. La solution est agitée et additionnée peu à peu de 30 mg d'hydrure d'aluminium-lithium. L'agitation est continuée pendant une nuit à la température ambiante, puis l'excès d'hydrure est détruit par trois gouttes d'eau. Le précipité d'alumine est essoré sur Schott et lavé à l'éther. Les solutions éthérées sont lavées à l'eau, séchées sur $SO_4Na_2$ et évaporées à sec. On obtient 115 mg d'alcool brut F = 77° qui sont recristallisés dans l'hexane-acétone, puis dans l'hexane, F = 95°, $[\alpha]_D$ = + 20° ($CHCl_3$, c = 1).

Analyse pour $C_{20}H_{34}O_3N_2$

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | C 68,53 | H 9,78 | N 7,99 | O, 13,70 |
| Tr. : | 68,38 | 9,69 | 8,17 | 13,62 |

Spectre IR ($CHCl_3$) :

bandes à 3440, 3385 et 1670 $cm^{-1}$ -CO-NH-

Spectre de RMN ($CDCl_3$-fig. 16) : l'intégration totale donne 34 ± 1 proton soit

entre 0,58 et 1,12 ppm 12 à 13 protons

dont à 0,70 ppm, 3 protons, doublet (J=6,5 c/s) $CH_3$-$CHR_2$
à 1,05 ppm, 6 protons, doublet (J=6,5 c/s) $(CH_3)_2$-CH-

à 2,18 ppm, 6 protons, singulet -$N(CH_3)_2$
à 2,53 ppm, 1 proton, doublet (J = 5,5 c/s) -CH-$NR_2$
à 2,71 ppm, 1 proton -OH
à 3,87 ppm, 2 protons -$CH_2OH$
entre 4,11 et 4,53 ppm, 2 protons, multiplet Ar-O-CH-CH-NH-
entre 6,87 et 7,45 ppm, 5 protons -CO-NH- et noyau benzénique monosubstitué.

Spectre de masse (fig. 18) :

pas de pic moléculaire.

pics m/e = 293 (1 %), 275 (1,5 %), 260 (1 %), 199 (1 %), 184 (1 %), 114 (16 %), 94 (6 %).

Hydrolyse alcaline de l'acide aminé 31c.

25 mg d'acide aminé 31c sont dissous dans 1 $cm^3$ de méthanol et additionnés de 0,25 $cm^3$ d'une solution de 2 g de soude en pastille dans 2,5 $cm^3$ d'eau. On porte à ébullition à reflux pendant 20 heures sous azote.

La chromatographie sur plaque éxécutée directement sur le mélange réactionnel (éluant : chlorure de méthylène à 7 % de méthanol) permet de mettre en évidence une tache colorée en violet-mauve de même $R_f$ qu'un témoin N-diméthyl-isoleucinamide.

Après évaporation du méthanol sous vide, on acidifie par l'acichlorhydrique et extrait par de l'éther. L'extrait éthéré est analysé par chromatographie sur plaque : l'éluant utilisé est le benzène et la révélation est obtenue par pulvérisation d'une solution d'acide sulfanilique diazoté alcalinisée par du carbonate disodique (Réactif de Pauly). On observe une tache de même $R_f$ et de même coloration jaune qu'un témoin de phénol.

La solution aqueuse est évaporée sous vide et le résidu repris par 2 $cm^3$ d'alcool absolu. La solution alcoolique, analysée sur plaque, ne donne aucune tache colorée en violet après révélation par la ninhydrine.

Hydrolyse alcaline de l'acide aminé 31c en présence de phénylalanine

25 mg de l'acide aminé 31c sont hydrolysés comme ci-dessus en présence de 10 mg de phénylalanine. Les chromatographies sur plaque sont éxécutées exactement dans les mêmes conditions. Le mélange réactionnel donne la tache caractéristique du N-diméthyl-isoleucinamide et l'extrait en milieu acide la tache du phénol ; le résidu de produits amphotères repris par l'alcool donne deux taches de même $R_f$ que la phénylalanine et la leucine.

## HYDROLYSE ALCALINE ET ACIDE DE LA DESOXOPANDINE

### Chloropandamine

1 g de pandamine est dissous dans 20 $cm^3$ d'acide acétique et additionné de 80 $cm^3$ d'acide chlorhydrique concentré. La solution est portée à 50° pendant 72 heures, puis refroidie dans la glace, alcalinisée à l'ammoniaque et extraite au chlorure de méthylène. La solution méthylénique, lavée à l'eau et séchée sur $SO_4Na_2$, est évaporée à sec. On obtient 970 mg de produit brut qui sont chromatographiés sur 40 g de mélange silice-célite. L'éluat est recueilli par fractions de 100 $cm^3$ et chaque fraction est analysée sur chromatoplaque (éluant : chlorure de méthylène à 7 % de méthanol).

| Solvant | Fractions | Poids brut | Chromatoplaque |
|---|---|---|---|
| $CH_2Cl_2$, $CH_3OH$ 1 % | 1-5 | 0,217 g | chloropandamine |
| $CH_2Cl_2$, $CH_3OH$ 2 % | 6-8 | 0,266 g | chloropandamine + acétylpandamine |
| $CH_2Cl_2$, $CH_3OH$ 4 % | 9-10 | 0,127 g | id. |
| $CH_2Cl_2$, $CH_3OH$ 10 % | 11-13 | 0,155 g | id. |
| id. | 14 | 0,088 g | acétylpandamine + pandamine |
| $CH_2Cl_2$, $CH_3OH$ 20 % | 15 | 0,063 g | pandamine |
| $CH_2Cl_2$, $CH_3OH$ 50 % | 16 | 0,020 g | |

Les fractions 1-5 éluées au chlorure de méthylène à 1 % de méthanol donnent sur les plaques une seule tache dont le $R_f$ est légèrement supérieur à celui de l'acétylpandamine et correspond à celui de la chloropandamine. Les fractions suivantes (6-13), éluées par du chlorure de méthylène à 2, 4 et 10 % de méthanol, donnent les taches de la chloropandamine et de l'acétylpandamine. Cette dernière tache, d'abord très faible, est plus importante dans les dernières fractions (11-13). Aucune séparation ne peut être obtenue par cristallisation et ces fractions sont chromatographiées à nouveau. La fraction 14 donne sur chromatoplaque deux taches de même $R_f$ que la pandamine et l'acétylpandamine et son spectre IR présente la bande ester à 1765 $cm^{-1}$ de l'acétylpandamine.

La chloropandamine pure à la chromatographie sur plaque est recristallisée deux fois dans l'acétone et présente les constantes suivantes : F = 270°, $[\alpha]_D$ = -123° ($CHCl_3$, c = 1).

Analyse pour $C_{31}H_{43}O_4N_4Cl$

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | C 65,19 | H 7,59 | N 9,81 | O 11,20 | Cl 6,21 |
| Tr. : | 65,32 | 7,67 | 9,62 | 11,43 | 6,22 |

Spectre IR (KBr) :

| | |
|---|---|
| bandes à 3300, 1650 et 1540 $cm^{-1}$ | -CO-NH- |
| bandes à 2780, 2830 et 2880 $cm^{-1}$ | $-N(CH_3)_2$ |
| bande à 3050 $cm^{-1}$ | C-H benzéniques |
| bande à 830 $cm^{-1}$ | C-Cl |

Spectre de RMN ($CF_3COOH$) : on trouve,

| | |
|---|---|
| entre 0,8 et 1,4 ppm, 12 protons | $CH_3$ aliphatiques |
| à 3,25 et 3,29 ppm, 6 protons | $-N(CH_3)_2$ |
| à 5,40 ppm, 1 proton à apparence de doublet | -CHCl |
| entre 6,5 et 7,7 ppm, 9 protons | cycles aromatiques |

Désoxopandamine

300 mg de chloropandamine, dissous dans 30 $cm^3$ d'un mélange d'alcool absolu et de chlorure de méthylène en présence de 300 mg de charbon palladié à 10 % et de 50 mg de carbonate acide de sodium, sont hydrogénés pendant 18 heures à la pression athmosphérique. Le catalyseur est éliminé par filtration et la solution évaporée à sec. Le résidu est hydrogéné encore 18 heures dans les mêmes conditions. Après filtration du catalyseur et évaporation de la plus grande partie du solvant, on dilue à l'eau et extrait au chlorure de méthylène. La solution méthylénique, lavée à l'eau et séchée sur $SO_4Na_2$, est mise à sec. On obtient 260 mg de produit brut, F = 285°, qui sont recristallisés deux fois dans l'alcool absolu, F = 300°, $[\alpha]_D$ = - 85° ($CHCl_3$-éthanol 80-20, c = 1).

Analyse pour $C_{31}H_{45}O_4N_4$

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | C 69,37 | H 8,26 | N 10,44 | O 11,92 |
| Tr. : | 69,17 | 8,50 | 10,68 | 11,95 |

Spectre IR (KBr) :

| | |
|---|---|
| bandes à 3300, 1650 et 1540 $cm^{-1}$ | -CO-NH- |
| bandes à 2780, 2830 et 2880 $cm^{-1}$ | $-N(CH_3)_2$ |
| bande à 3050 $cm^{-1}$ | C-H benzéniques |

Spectre de RMN ($CF_3COOH$) :

pas de proton dans la région des 5,3 ppm.

Une plus grande quantité de désoxopandamine a été préparée par hydrogénation d'une chloropandamine brute, obtenue selon la méthode décrite plus haut à partir de 5 g de pandamine. L'acétylpandamine présente dans le produit brut d'hydrogénation est saponifiée par

contact une nuit avec une solution de potasse environ n dans un mélange de méthanol et de chlorure de méthylène (50-50). Après évaporation de la plus grande partie du solvant sous vide, on extrait au chlorure de méthylène. L'extrait méthylénique (4,600 g) est constitué par de la désoxopandamine et une faible quantité de pandamine qui, nettement plus polaire, peut-être séparée facilement par chromatographie sur silice (18 g). Au chlorure de méthylène contenant 2 % de méthanol on élue ainsi en tête 4,150 g de désoxopandamine F = 285°, pure à la chromatographie sur plaque.

Hydrolyse alcaline de la désoxopandamine :

1,500 g de désoxopandamine sont mis en suspension dans 60 $cm^3$ de méthanol et additionnés d'une solution de 12 g de soude solide dans 15 $cm^3$ d'eau. On porte à ébullition à reflux pendant 60 heures sous azote. Après ce temps, il ne reste plus de produits non dissous.

Isolement de la tyramine

Le mélange réactionnel est évaporé sous vide. Le méthanol est ainsi éliminé et la solution aqueuse résiduelle est extraite au chlorure de méthylène. L'extrait méthylénique (245 mg) donne sur chromatoplaque la tache caractéristique du N-diméthyl-isoleucinamide et une tache faible de même $R_f$ que la désoxopandamine. La solution aqueuse est acidifiée par de l'acide chlorhydrique jusqu'à pH 2. Les acides sont extraits à l'éther (460 mg). Les produits restés en solution dans l'eau sont mis à sec et épuisés par trois fois 50 $cm^3$ d'alcool absolu. La solution alcoolique est évaporée ; le résidu dissous dans 50 $cm^3$ d'eau est passé sur une colonne d'Amberlite CG 120 (15 $cm^3$) en phase acide. Après lavage de la résine à l'eau, on élue par de l'ammoniaque à 3 %. La première fraction d'élution (50 $cm^3$ de solution ammoniacale), évaporée à sec, fournit 360 mg d'un mélange qui, sur chromatoplaque, donne les taches correspondant à la phénylalanine et à la leucine ainsi qu'une tache très faible de même $R_f$ que la tyramine. Les fractions suivantes (300 $cm^3$) fournissent 418 mg de produits. Sur plaque, on observe une tache nette correspondant à la tyramine ($R_f$ légèrement inférieur à celui de la p-hydroxy-phényl-2 méthoxy-2 éthylamine, 19) et des taches faibles correspondant aux acides aminés. On reprend par du chlorure de méthylène contenant 10 % de méthanol. L'insoluble, soit 67 mg d'un mélange de leucine et de phénylalanine, est éliminé par filtration et le filtrat évaporé. Le résidu est chromatographié sur 13 g de silice-célite. L'éluat est recueilli par fractions de 50 $cm^3$ et chaque fraction est analysée par chromatographie sur plaque.

| Solvant | Fractions | Poids brut | Chromatoplaque (révélation ninhydrine) |
|---|---|---|---|
| $CH_2Cl_2$, $CH_3OH$ 10 % | 1-4 | 0,063 g | 0 |
| $CH_2Cl_2$, $CH_3OH$ 20 % | 5-6 | 0,107 g | tyramine |
| id. | 7-11 | 0,124 g | tyramine + phénylalanine (faible) |
| $CH_2Cl_2$, $CH_3OH$ 50 % | 12-16 | 0,040 g | phénylalanine faible |

Les fractions 5-6 sont recristallisées deux fois dans l'alcool absolu. On obtient 52 mg de tyramine F = 164°, non déprimé par mélange avec un échantillon de référence, spectre IR superposable à celui de l'échantillon.

Hydrolyse acide de la désoxopandamine :

2,750 g de désoxopandamine sont dissous dans 70 $cm^3$ d'acide acétique, puis additionnés de 140 $cm^3$ d'acide chlorhydrique et de 70 $cm^3$ d'eau. Après 60 heures de reflux sous azote, on évapore le mélange réactionnel sous vide. Le résidu, après élimination de l'excès d'acide chlorhydrique par la méthode décrite plus haut au cours de l'hydrolyse acide partielle de la pandamine, est dissous dans 200 $cm^3$ d'eau, alcalinisé par de l'ammoniaque et extrait au chlorure de méthylène. La solution méthylénique, lavée à l'eau et séchée sur $SO_4Na_2$, est évaporée à sec. L'extrait méthylénique qui pèse 1 g est chromatographié sur 40 g de silice-célite. Au chlorure de méthylène à 3 % de méthanol, on élue en tête 785 mg de désoxopandamine F = 285°.

La solution aqueuse est filtrée ce qui permet d'éliminer des produits résineux bruns (150 mg) et le filtrat est évaporé sous vide. Le mélange de chlorhydrates obtenu est dissous dans 80 $cm^3$ d'eau et passé sur une colonne de 40 $cm^3$ d'Amberlite CG 120 en phase acide, qui est ensuite lavée à l'eau. Après évaporation, les solutions recueillies en bas de la colonne ne fournissent que des traces de produits bruns.

Les produits fixés par la résine sont élués par de l'ammoniaque à 3 % (600 $cm^3$). La solution ammoniacale est évaporée et le résidu qui pèse 1,406 g est analysé par chromatographie sur plaque. Après révélation par la ninhydrine, on observe une tache de même $R_f$ que la phénylalanine, une tache légèrement plus migrée qui correspond à l'acide aminé 40 et une tache faible de même $R_f$ que la tyramine. L'amino-acide 40 peut également être révélé par le réactif de Dragendorff-acide sulfurique.

Isolement de l'amino-acide 40

Le mélange de produits amphotères élué de la résine sulfonique est dissous dans 100 $cm^3$ d'eau et passé sur une colonne de 30 $cm^3$ d'Amberlite IRC 50. La colonne est lavée à l'eau ; la solution passée et les eaux de lavage, réunis à sec, fournissent 515 mg de L-phénylalanine brute, dont le spectre IR est superposable à celui d'un échantillon. Les produits fixés par la résine sont élués par de l'ammoniaque à 3 %. La solution alcaline est évaporée et le résidu, soit 830 mg, cristallisé dans le méthanol-éther. On obtient 302 mg d'amino-acide 40 brut F = 240°. Après deux recristallisations dans un mélange alcool-eau, le point de fusion s'élève à 248°, $[\alpha]_D$ = +9° (alcool-ClH 0,1 n 50-50, c = 1).

Analyse pour $C_{22}H_{37}O_4N_3$, 1/2 $H_2O$

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | C 63,43 | H 9,20 | N 10,08 | O 17,28 |
| Tr. : | 63,17 | 9,04 | 10,31 | 17,37 |

Spectre IR (Nujol) :

| | |
|---|---|
| trois bandes H mobiles entre 3360 et 3540 cm | |
| bande à 2200 $cm^{-1}$ | $NH_3^+$ |
| bandes à 1660 et 1640 $cm^{-1}$ | C=O d'amide |
| bande à 1580 $cm^{-1}$ | $COO^-$ |
| bande à 1245 $cm^{-1}$ | éther aromatique |

Pyrolyse de l'amino-acide 40

23 mg de l'acide aminé 40, F = 240°, sont sublimé à 210-220° pendant 16 heures. On distingue dans le sublimat trois parties, soit, à partir de l'extrémité du tube :

- un produit blanc cristallisé F = 112°, dont le spectre IR est superposable à celui du L-(N-diméthyl) isoleucinamide décrit plus loin.

- un produit jaune qui est analysé par chromatographie sur plaque. On observe une seule tache révélée par la ninhydrine de même $R_f$ que la tyramine.

- un produit blanc F = 242° dont le spectre IR est superposable à celui de l'amino-acide 40.

Acétylation de l'amino-acide 40. - Produit 41

205 mg de l'acide aminé 40, F = 240°, sont dissous dans 5 $cm^3$ de méthanol et additionnés de 0,75 $cm^3$ d'anhydride acétique. Après une nuit à la température ambiante, on évapore à sec sous vide. L'excès d'anhydride acétique est éliminé par addition de petites quantités d'un mélange méthanol-chloroforme ajoutées au ré-

sidu. Ce dernier est cristallisé dans le méthanol-éther et donne 145 mg de produit acétylé 41, F = 194°. Après deux recristallisations dans le même mélange de solvants, le point de fusion s'élève à 197°. $[\alpha]_D$ = +5° (méthanol, c = 1).

Analyse pour $C_{24}H_{39}O_5N_3$, 1/2 $H_2O$

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | C 62,94 | H 8,77 | O 19,15 | N 9,14 |
| Tr. : | 63,14 | 8,83 | 18,93 | 9,20 |

Spectre IR (Nujol) :

bandes à 3200, 3380, 1670 et 1650 $cm^{-1}$ -CO-NH-
bande à 1245 $cm^{-1}$ éther aromatique

Estérification du dérivé 41. - Produit 42.

95 mg de dérivé 41 sont dissous dans un mélange de 1,5 $cm^3$ de méthanol et 1,5 $cm^3$ de chlorure de méthylène, puis additionnés de 10 $cm^3$ de solution éthérée de diazométhane. Après une nuit à la température ambiante, on évapore à sec. Par recristallisation dans l'acétone on obtient 55 mg d'ester 42, F = 152°, $[\alpha]_D$ = + 2,5° ($CHCl_3$, c = 1,8).

Analyse pour $C_{25}H_{41}O_5N_3$

| | | | |
|---|---|---|---|
| Calc. % : C | 64,76 | H 8,92 | N 9,07 |
| Tr. : | 64,92 | 9,07 | 9,22 |

Spectre IR (Nujol) : bande à 1750 $cm^{-1}$ ester

Spectre de RMN ($CDCl_3$-fig. 19) : l'intégration donne 42 ± 1 protons, soit

entre 0,63 et 1,2 ppm, 12 à 13 protons,
dont à 0,75 ppm, 3 protons, doublet (J=6,5 c/s) $CH_3$-$CHR_2$
à 1,06 ppm, 6 protons, doublet (J=6,5 c/s) $(CH_3)_2$-CH-
à 1,93 ppm, 3 protons, singulet -NH-CO-$CH_3$
à 2,21 ppm, 6 protons, singulet -$N(CH_3)_2$
à 2,53 ppm, 1 proton, doublet (J=5 c/s) -CH-$NR_2$
à 2,72 ppm, 2 protons, triplet (J=6,5 c/s) -$CH_2$-
à 3,38 ppm, 2 protons, triplet (J=6,5 c/s) -$CH_2$-
à 3,71 ppm, 3 protons, singulet -$COOCH_3$
à 4,29 ppm, 1 proton, quadruplet (J=4 c/s, J'=7,5 c/s) -CH-O-Ar
à 5,02 ppm, 1 proton, quadruplet (J=4 c/s, J"=8,7 c/s) -CH-NH-
à 5,7 ppm, 1 proton, pic large -NH-CO-$CH_3$
entre 6,7 et 7,2 ppm, 5 protons -CO-NH- et noyau benzénique para-disubstitué.

STEREOCHIMIE

L-(N-diméthyl) isoleucinamide

Il est isolé à partir des fractions 6-9 de la chromatographie qui a conduit d'autre part à l'obtention de l'amino-acide 31c. Ces fractions, après dissolution dans l'eau, sont alcalinisées par l'ammoniaque et extraites à l'éther. L'extrait éthéré est sublimé et fournit 17 mg de L-(N-diméthyl) isoleucinamide, F = 112°, $[\alpha]_D$ = - 5° ($CHCl_3$, c = 1).

Spectre IR :

1 - dans $CCl_4$ : identique à celui de l'isomère alloiso
2 - dans le Nujol (fig. 22) :

bandes à 3335, 3150, 1680 et 1640 $cm^{-1}$ $-CONH_2$
bandes à 1280, 1267, 1242, 1200, 1170, 1160, 1145, 1120, 1100, 1055, 1037 et 982 $cm^{-1}$, formant un ensemble caractéristique et différent de l'isomère alloiso.

Spectre de RMN ($CDCl_3$) : l'intégration donne 18 ± 1 protons, soit,

| | |
|---|---|
| entre 0,80 et 1,06 ppm, 6 protons | $\underline{CH_3}-CH_2-\underset{\underline{\quad}}{CH}-\underline{CH_3}$ |
| à 2,30 ppm, 6 protons, singulet | $-N(CH_3)_2$ |
| à 2,58 ppm, 1 proton, doublet (J = 5,5 ppm) | $-\underset{\underline{\quad}}{CH}-NR_2$ |
| à 6,2 ppm, 2 protons, pic large | $-NH_2$ |

Synthèse du L-(N-diméthyl) isoleucinamide :

L-(N-diméthyl) isoleucine

2 g de L-isoleucine (pure sans alloiso) sont hydrogénés, en solution dans un mélange méthanol-eau (50-50), en présence de 7 $cm^3$ de formol à 30 % et de 2 g de charbon palladié à 10 %, pendant une nuit à la pression athmosphérique. La quantité théorique d'hydrogène est absorbée. Le charbon est filtré et la solution évaporée à sec. L'excès de formol est éliminé par évaporation de petites quantités d'eau ajoutées au résidu. Le produit brut est cristallisé dans le méthanol-acétone et fournit 1,450 g de L-(N-diméthyl) isoleucine, F = 178°, $[\alpha]_D$ = +50° (méthanol, c = 2).

Analyse pour $C_8H_{17}O_2N$

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | C 60,34 | H 10,76 | N 8,80 | O 20,10 |
| | 60,16 | 10,64 | 8,58 | 20,40 |

Spectre de RMN (eau lourde) :

| | |
|---|---|
| signaux entre 8,2 et 1,10 ppm | $CH_3$ aliphatiques |
| singulet à 2,92 ppm | $-N(CH_3)_2$ |
| doublet (J = 4,5 c/s) à 3,54 ppm | $-CH-NR_2$ |

L-(N-diméthyl) isoleucinamide.

800 mg de L-(N-diméthyl) isoleucine sont dissous dans 200 $cm^3$ de chlorure de méthylène. A la solution refroidie dans la glace, on ajoute 0,6 $cm^3$ de chlorocarbonate d'éthyle et 0,85 $cm^3$ de triéthylamine. Après 30 mn de contact, la solution est saturée d'ammoniac à 0°. Après 90 mn, on ajoute quelques $cm^3$ d'eau et décante la phase méthylénique qui est ensuite lavée avec une solution saturée de chlorure de sodium, séchée sur $SO_4Na_2$ et évaporée à sec. Le résidu (600 mg) est chromatographié sur 24 g de silice-célite. On élue en tête, au chlorure de méthylène à 1 % de méthanol, 232 mg de carbamate d'éthyle, F = 45°, spectre IR superposable à celui d'un échantillon. Les fractions suivantes, éluées au chlorure de méthylène à 5% de méthanol, fournissent 310 mg de L-(N-diméthyl) isoleucinamide F = 109°. Par recristallisation dans le méthanol-hexane, le point de fusion s'élève à 112°, $[\alpha]_D$ = -5° ($CHCl_3$, c = 1).

Analyse pour $C_8H_{18}ON_2$

| | C | H | N | O |
|---|---|---|---|---|
| Calc. % : | 60,72 | 11,47 | 17,70 | 10,11 |
| Tr. : | 60,61 | 11,28 | 17,84 | 10,24 |

Spectre IR et spectre de RMN superposables à celui du produit obtenu à partir de la pandamine.

Détermination de la configuration du carbone assymétrique portant la fonction alcool, selon la méthode de A. HOREAU (67) :

A 30 mg de pandamine (0,54 millimoles), on ajoute 250 mg d'une solution de pyridine contenant 36 mg d'anhydride α-phényl butyrique (1,15 millimoles). La solution homogène est abandonnée 15 heures, puis on ajoute une goutte d'eau pour hydrolyser à froid l'excès d'anhydride. Après une heure, on titre par la soude 0,1 n en présence de phénolphtaléine ; versé 1,76 $cm^3$. Si l'estérification ne s'était pas produite, la totalité de l'anhydride hydrolysé aurait consommé 2,3 $cm^3$ ; il a donc disparu 0,54 $cm^3$, ce qui correspond à la quantité théorique nécessaire pour l'estérification de toute la pandamine mise en jeu. Le rendement de l'estérification est donc sensiblement de 100 %. La phase sodique est séparée du chloroforme et lavée de nouveau au chloroforme pour éliminer les produits neutres. On acidifie la phase aqueuse avec de l'acide chlorhydrique dilué et on extrait l'acide α-phényl butyrique ainsi li-

béré par plusieurs petites portions de benzène. Les solutions benzéniques, séchées, sont amenées à un volume de 2 $cm^3$. On lit sous 1 dm : -0,174.

Si la stéréospécificité était totale, la rotation obtenue serait (PM de l'acide $\alpha$-phényl butyrique = 164 ; $[\alpha]_D$ = -96,5° dans le benzène) :

$$\frac{30 \times 164 \times 96,5}{552,7 \times 2 \times 1000} = 0,430 ;$$

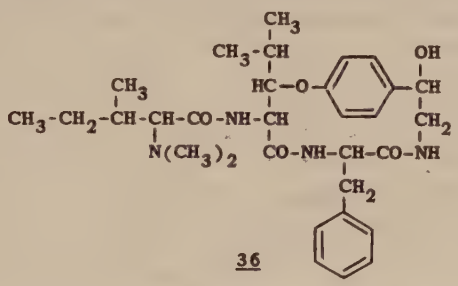
le rendement optique est donc de $\frac{0,174 \times 100}{0,430} = 40\ \%$.

Il a été en outre vérifié que la dispersion rotatoire est celle de l'acide $\alpha$-phényl butyrique optiquement pur.

oOo

# CONCLUSION

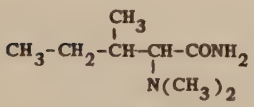
Au cours de ce travail, la structure plane de la pandamine 36, alcaloïde extrait des écorces de racine du Panda oleosa Pierre, a été déterminée et sa stéréochimie partiellement établie.



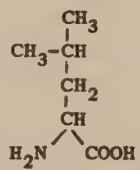
36

La formule développée de la pandamine a été déduite essentiellement.

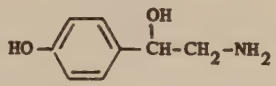
- des résultats de l'hydrolyse alcaline qui a permis d'isoler la phénylalanine 4, la leucine 18, le N-diméthyl-isoleucinamide 12, et l'octopamine 17, ces deux derniers fragments ayant été reproduits par synthèse,



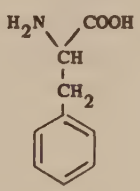
12



18

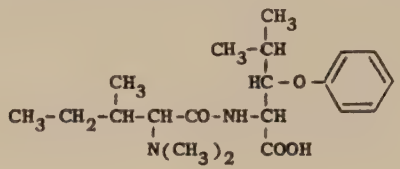


17



4

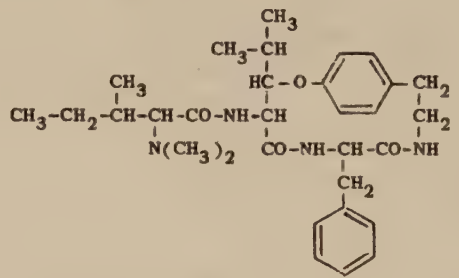
- et des résultats de l'hydrolyse acide partielle, qui a conduit à l'isolement, à côté de la phénylalanine, de l'acide aminé 31c dont la structure a été établie par spectrométrie de RMN.



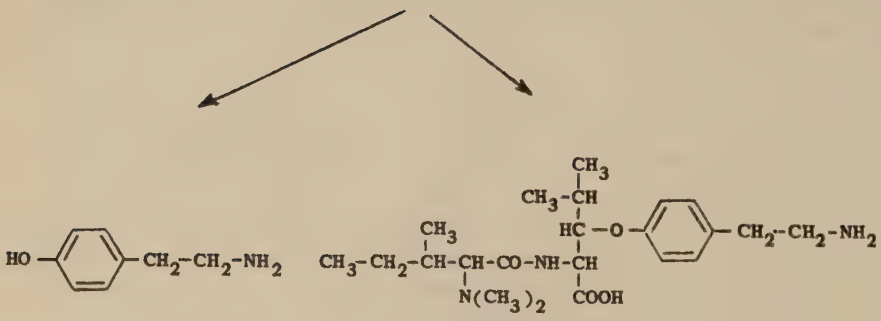
31c

La formation de leucine au cours de l'hydrolyse alcaline de la pandamine s'explique par la transamination d'un intermédiaire cétonique avec la phénylalanine.

Cette formule a été confirmée par hydrolyse alcaline et acide de la désoxopandamine 37 conduisant respectivement à la tyramine 39 et à l'acide aminé 40.



37



39 40

Parmi les alcaloïdes, la pandamine présente une structure tout à fait nouvelle puisque les seuls alcaloïdes peptidiques connus jusqu'à présent sont ceux de l'Ergot de Seigle dont la structure est nettement différente.

Cependant, il est apparu que la pandamine ne constitue pas un type d'alcaloïde isolé dans le règne végétal. En effet, avant d'entreprendre cette étude, nous avions extrait d'une plante appartenant à la famille des Sterculiacées, le Waltheria americana, trois alcaloïdes, les adouétines X, Y et Z de structure sans doute très proche de celle de la pandamine (72).

D'autre part, E. L. MENARD et Coll. ont isolé récemment à partir du Zizyphus oenoplia (Rhamnacées), deux composés peptidiques et basiques, la zizyphine et la zizyphinine, dont une première étude succinte semble indiquer une certaine parenté avec la pandamine (73).

On pourrait rapprocher aussi la pandamine des nombreuses substances peptidiques et cycliques, plus ou moins complexes et non basiques (ou dont la basicité est dûe parfois à la présence de groupes amine primaire libres) qui ont été décrites au cours de ces dernières années. Ce sont essentiellement, soit des produits toxiques d'origine fongique comme la phalloïdine (74) ou la lycomarasmine (75), soit surtout des antibiotiques issus de bactéries ou de champignons inférieurs (76). Mais, parmi ces substances, la molécule de pandamine présente une originalité certaine dûe à la nature d'une partie des éléments qui la constituent : le N-diméthyl-amino-acide auquel elle doit sa basicité et l'octopamine, aminophénol qui jusqu'ici a été isolé seulement à l'état libre, ainsi qu'à l'enchaînement de tous les éléments constitutifs entre eux. Ceux-ci forment un cycle qui comporte une fonction éther-oxyde placée en β d'une liaison peptidique et une chaîne aliphatique rattachée en 1-4 à un noyau benzénique, l'ensemble conférant à la molécule une réactivité tout à fait particulière vis à vis de l'hydrolyse alcaline ou acide.

oOo

## BIBLIOGRAPHIE


1 - Index Kewensis, 8° supplément, p. 170.

2 - A. ENGLER, Syllabus der Pflanzenfamilien, 12° ed., Vol. II, 1964, p. 289.

3 - J. HUTCHINSON, The Families of Flowering Plants, Oxford University Press, London, 1959, p. 309.

4 - Communication particulière, Royal botanic gardens, Kew.

5 - W. ROBYNS, editor, Flore du Congo-Belge et du Ruanda-Urundi, 1952, 7, 1.

6 - O. BLANPIN et X. MONSEUR, Revue médicale de Tours, 1960, 681.

7 - K. DJERASSI, R.R. ENGLE et A. BOWERS, J. org. Chem., 1956, 21, 1547.

8 - A.I. SCOTT, Interpretation of the UV Spectra of natural Products, Pergamon Press, 1964, p. 110.

9 - B.C.L. WEEDON, Technique of Organic Chemistry, A. Weissberger ed., Interscience, New-York, London, 1963, p. 655.

10 - W. KELLER-SHIRLEIN, M.L. MIHAILOVIE et V. PRELOG, Helv. chim. Acta, 1959, 42, 305.

11 - P. POTIER, Thèse de Doctorat ès Sciences, Paris, 1960

P. POTIER, J. LE MEN, M. -M. JANOT et P. BLADON, Tetrahedron Letters, 1960, 36

12 - A.T. JAMES, Methods of Biochemical Analysis, D. Glick ed., Interscience, New-York, London, 1960, Vol. 8, p. I.

13 - M. JUSTISZ, Chromatographie en Chimie organique et biologique, Masson et Cie ed., 1960, Vol. II, p. 299.

14 - H. VANDERHAEGHE et G. PARMENTIER, J. amer. chem. Soc., 1960, 82, 4414.

15 - W. KELLER-SHIRLEIN et V. PRELOG, Helv. chim. Acta, 1957, 40, 205.

16 - A.L. LEVY et D. CHUNG, Anal. Chem., 1953, 25, 396.

17 - F. SANGER, Advanced in Protein Chem., 1952, 7, 23.

18 - A. NEUBERGER, Advanced in Protein Chem., 1943, 4, 340.

19 - J.W.H. LUGG, Biochem. J., 1938, 32, 775.

J.C. SHEEHAN, P.E. DRUMMOND, J.N. GARDNER, K. MAEDA, D. MANIA, S. NAKAMURA, A.K. SEN et J.A. STOCK, J. amer. chem. Soc., 1963, 85, 2867.

H. NAGAWA, K. MAEDA, H. UMEZAWA, J. Antibiotics, 1964, 17 Ser. A, 129.

20 - A.L. GLENN, Quart. Rev., 1954, 8, 192.

21 - W.A. JACOBS et L.C. CRAIG, J. biol. Chem., 1935, 110, 521.

22 - A. STOLL, A. HOFMANN et B. BECKER, Helv. chim. Acta, 1943, 26, 1602.

23 - A. STOLL et A. HOFMANN, Helv. chim. Acta, 1950, 33, 1705.

24 - K. BIEMANN, Mass Spectrometry, Organic chemical applications, Mc Graw Hill, Inc., New-York, 1962, a) p. 91 ; b) p.111 ; c) p. 123 ; d) p. 295.

25 - R.E. BOWMAN, J. chem. Soc., 1950, 1349.

26 - V.M. INGRAM, J. biol. Chem., 1963, 202, 193.

27 - R.A. BOISSONNAS, Helv. chim. Acta, 1951, 34, 874.

28 - J.R. VAUGHAN Jr et R.L. OSATO, J. amer. chem. Soc., 1952, 74, 676.

29 - T. WIELAND et H. BERNHARD, Ann., 1951, 572, 190.

30 - N. IZUMIYA, S.C. FU, S.M. BIRNBAUM et J.P. GREENSTEIN, J. biol. Chem., 1953, 205, 221.

31 - E. BOYLAND et E. RHODEN, Biochem. J., 1949, 44, 528.

32 - S. LISSITZKY et G. LAURENT, Bull. Soc. Chim. biol., 1955, 37, 1177.

33 - S.M. PATRIDGE, Biochem. J., 1949, 44, 521.

34 - F.W. EASTWOOD, B.K. SNELL et A. TODD, J. chem. Soc., 1960, 2286.

35 - P. PRATESI, A. LA MANNA, A. CAMPIGLIO et V. GHISLANDI, J. chem. Soc., 1959, 4062.

36 - K.W. ROSENMUND, Ber., 1909, 42, 4478.

K.W. ROSENMUND, Ber., 1913, 46, 1034.

37 - W.E. PARHAM et F.L. RAMP, J. amer. chem. Soc., 1951, 73, 1293.

38 - M. ASSCHER, Rec. Trav. chim., 1949, 68, 962.

39 - G. FODOR, O. KOVACS et T. MECHER, Acta chim. Acad. sci. hung., 1951, I, 395.

40 - C. MANNICH et E. THIELE, Arch. Pharm., 1915, 253, 185.

41 - Y. KAKIMOTO et M.D. ARMSTRONG, J. biol. Chem., 1962, 237, 422.

42 - V. ERSPAMER, Nature, 1952, 169, 375.

43 - I. STEWART et T.A. WHEATON, Science, 1964, 145, 60.

44 - R.J. CONCA et W. BERGMAN, J. org. Chem., 1953, 18, 1104.

45 - V.V. ERSHOV, A.A. VOLOD'KIN et G.N. BOGDANOV, Russ. chem. Rev., 1963, 32, 75.

46 - C. PAAL et H. SENNINGER, Ber., 1894, 27, 1799.

47 - H. HELMANN et J.L.W. POHLMAN, Ann., 1961, 642, 28.

48 - M.M. CHEMIAKINE, E.S. TCHAMAN, L.I. DENISOVA, G.A. RAVDEL et W.J. RODIONOV, Bull. Soc. chim., 1959, 26, 530.

49 - T. WIELAND et L. WIRTH, Chem. Ber., 1949, 82, 468.

50 - R. CONSDEN, A.H. GORDON et A.J.P. MARTIN, Biochem. J., 1947, 41, 596.

51 - L. SKULSKI, G.C. PALMER et M. CALVIN, Tetrahedron Letters, 1963, 1773.

L. SKULSKI, G.C. PALMER et M. CALVIN, Ann. Soc. chim. polonorum, 1964, 38, 789.

C. FRANCONI, Elektrochem., 1961, 65, 645.

V.J. KOWALEWSKI et D.G. de KOWALEWSKI, J. chem. Phys., 1960, 32, 1272.

52 - I. PHOTAKI, J. amer. chem. Soc., 1963, 85, 1123.

53 - S. GINSBURG et I.B. WILSON, J. amer. chem. Soc., 1964, 86, 4716.

54 - A. PATCHORNIK et M. SOKOLOVSKY, J. amer. chem. Soc., 1964, 86, 1206.

55 - M. SOKOLOVSKY, T. SADEH et A. PATCHORNIK, J. amer. chem. Soc., 1964, 86, 1212.

56 - G. RILEY, J.H. TURNBULL et W. WILSON, J. chem. Soc., 1957, 1373.

57 - R.M. HERBST, J. amer. chem. Soc., 1936, 58, 2239.

58 - R.M. HERBST et D. RITTENBERG, J. org. Chem., 1943, 8, 380.

59 - E. ZIEGLER, H. MARELLA et I. SIMMLER, Ber., 1943, 76 664.

60 - A. CHATTERJEE, S.R. SRIMANY et B. CHAUDHURY, J. chem. Soc., 1961, 4576.

61 - K. VOEGLER, Helv. chim. Acta, 1950, 33, 2111.

62 - R.B. WOODWARD et W.E. DOERING, J. amer. chem. Soc. 1945, 67, 870.

63 - H.J. SVEC et G.A. JUNK, J. amer. chem. Soc., 1964, 86, 2278.

64 - G. W. KENNER et R.C. SHEPPARD, Nature, 1958, 181, 48.

65 - J.C. SHEEHAN, K. MAEDA, A.K. SEN et J.A. STOCK, J. amer. chem. Soc., 1962, 84, 1303.

66 - S. DALBY, G.W. KENNER et R.C. SHEPPARD, J. chem. Soc., 1960, 968.

67 - A. HOREAU, Tetrahedron Letters, 1961, 506.
A. HOREAU, Tetrahedron Letters, 1962, 965.

68 - P. PRATESI, A. LA MANNA, A. CAMPIGLIO et V. GHISLANDI, J. chem. Soc., 1958, 2069.

69 - I. STEWART, W.F. NEWHALL et G.J. EDWARDS, J. biol. Chem., 1964, 239, 930.

70 - S. MOORE et W.H. STEIN, J. biol. Chem., 1951, 192, 663.

71 - T. CURTIUS, Ber., 1898, 31, 2490.

72 - M. PAIS, J. MAINIL et R. GOUTAREL, Ann. pharm. fr., 1963, 21, 139.

M. PAIS, X. MONSEUR, X. LUSINCHI et R. GOUTAREL, Bull. Soc. chim., 1964, 817.

73 - E.L. MENARD, J.M. MULLER, A.F. THOMAS, S.S. BHATNAGAR et N.J. DASTOOR, Helv. chim. Acta, 1963, 46, 1801.

74 - T. WIELAND et H.W. SCHNABEL, Ann., 1962, 657, 225.

75 - E. HARDEGGER, P. LIECHTI, L.M. JACKMAN, A. BOLLER et P.A. PLATTNER, Helv. chim. Acta, 1963, 46, 61.

76 - J.P. GREENSTEIN et M. WINITZ, Chemistry of the amino-acides John Wiley et Sons, Inc., New-York, 1961, p.

D.T. ELMORE, Ann. Reports, 1961, 310.

R.C. SHEPPARD, Ann. Reports, 1963, 462.

H. IWASAKI et B. WITKOP, J. amer. chem. Soc., 1964, 86, 4698.

oOo

## DEUXIÈME THÈSE

## Propositions données par la Faculté

*"SPECTRES DE MASSE DES PEPTIDES"*

**Vu et approuvé :**

**Paris, le 17 mars 1965**

**Le Doyen de la Faculté des Sciences,**

**Marc ZAMANSKY**

Vu

et Permis d'imprimer :

**Le Recteur de l'Académie de Paris,**

Jean ROCHE

AGEMP